©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.zobodat.at

NATURHIST. MUSEUM WIEN
SCHRIFTENTAUSCH

Zum anaeroben Energiestoffwechsel von Evertebraten*

Von WILHELM R. VOGEL

Mit 7 Abbildungen

(Vorgelegt in der Sitzung der mathem.-naturw. Klasse am 30. April 1986 durch das w. M. WILHELM KÜHNELT)

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung
2. Beispiele für die ökologische Einnischung fakultativer Anaerobier
3. Mechanismen der anaeroben Bildung von End- bzw. Zwischenprodukten
   1. Lactat
   2. Octopin
   3. Alanopin, Strombin und Ornithin
   4. Aspartat
      1. Das Kohlenstoffskelett von Aspartat
      2. Der Weg der Aminogruppe von Aspartat
   5. Alanin, andere Aminosäuren
   6. Malat
      1. Reaktionen von PK und PEPCK
   7. Succinat
   8. Acetat und Propionat
4. Diskussion
   1. Ausgleich der Redoxbilanz
   2. Energieliefernde Reaktionsschritte
5. Zusammenfassung
6. Literatur

1. Einleitung

Tierisches Leben, wie wir es heute kennen, ist in sehr hohem Ausmaß an das Vorhandensein von Sauerstoff gebunden. Unter Beteiligung von atmosphärischem Sauerstoff können die mit der Nahrung aufgenommenen Kohlenstoffverbindungen weitgehend oxidiert und damit energetisch optimal verwertet werden. Die Evolution sauerstoffverbrauchender Mechanismen wurde erst möglich, nachdem durch die grünen Pflanzen mittels Reduktion von CO_2 dieses Gas in großem Ausmaß gebildet worden war. An die Stelle der reduzierenden Uratmosphäre ist damit eine oxidierende Atmosphäre getreten. Dennoch ist bei wahrscheinlich allen Arten die Fähigkeit zur anaeroben Energiegewinnung erhalten geblieben, wenn auch oft nur auf der Ebene einzelner Zellen und Gewebe. Zahlreiche

* Meinen Eltern Martha und Friedrich Vogel gewidmet.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.zobodat.at

Vertreter aus systematisch verschiedenen Tiergruppen haben darüber hinaus die Fähigkeit zur Anaerobiose nicht nur beibehalten, sondern in Anpassung an ihre Lebensräume und wohl auch im Zuge der Erschließung neuer Biotope weiter ausgebaut. Aber nicht nur ein Absinken der Sauerstofftension des umgebenden Mediums unter die Nutzungsschwelle kann Ursache für Anaerobiose (bzw. Hypoxybiose) sein. Auch Anpassung an andere Umweltparameter oder unzureichende Sauerstoff-Versorgungsstrukturen im Organismus (vor allem bei hoher Belastung) können dazu führen.

In dieser Arbeit soll an Hand einiger Beispiele gezeigt werden, welche ökologischen und physiologischen Gegebenheiten bei Evertebraten Anaerobioseadaptationen bedingen. Daran anschließend werden die Mechanismen anaerober Energiegewinnung besprochen.

2. Beispiele für die ökologische Einnischung fakultativer Anaerobier

Bei der Milchsäuregärung, der „klassischen", vor allem am Vertebratenmuskel untersuchten Form anaeroben Stoffwechsels werden nur 2 Mol ATP pro Mol Glucose anstelle der aerob möglichen 36 Mol gewonnen. Fast alle im Folgenden zitierte Arten weichen jedoch von diesem Schema ab. Statt dessen, oder zumindest zusätzlich, werden andere, weiterreichende Stoffwechselwege beschritten. Es ist jedoch für keine Metazoenart wirklich eindeutig bewiesen, daß auch alle Entwicklungsstadien – und damit der gesamte Lebenszyklus – rein anaerob ablaufen können (s. z. B. SMITH, 1969). Am ehesten könnte dies noch für jene mikroskopisch kleinen Arten gelten, welche in den sauerstofffreien, schwefelwasserstoffhältigen marinen Sedimenten leben. Hier lassen ökologische Untersuchungen weitestgehende Anaerobioseadaptationen vermuten (s. z. B. FENCHEL, 1969, 1970; FENCHEL u. RIEDL, 1970).

Auch die Schlammbewohner stehender oder träge fließender Süßgewässer sind sehr oft mit mangelndem Sauerstoffgehalt des sie umgebenden Mediums konfrontiert (Bivalvia: GÄDE u. Mitarb., 1976; Oligochaeta: SCHÖTTLER, 1975 u. 1976; HOFFMANN u. Mitarb., 1979; siehe auch BEADLE, 1961; LINDEMANN, 1942, und SCHIEMER u. Mitarb., 1968). Wie auch im ähnlichen Biotop beheimatete Chironomidenlarven (WILPS u. ZEBE, 1976) können sie eine mehrtägige Abwesenheit von Sauerstoff überleben.

Ähnliches gilt für Bewohner mariner Gezeitenzonen und astatischer Süßgewässer. Bei Niedrigwasser oder Austrocknung ist ihnen aus Gründen des Verdunstungsschutzes die Aufnahme von Sauerstoff nicht oder nur in sehr eingeschränktem Umfang möglich (Anneliden: ZEBE, 1975; SCHÖTTLER, 1978 u. 1980; Mollusken: KÜHNELT, 1938; MEENAKSHI, 1956, 1958 u. 1964, die letzten beiden Arbeiten zit. nach NOPP, 1974; BAYNE, 1971; COLEMAN u. TRUEMAN, 1971; DE ZWAAN u. ZANDEE, 1972 b; KLUYTMANS u. Mitarb., 1975 u. 1977; BAYNE u. LIVINGSTONE, 1977, und WIDDOWS u. Mitarb., 1979. Weitere einschlägige Untersuchungen über Prosobranchier und Basommatophora s. z. B.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.zobodat.at

BRAND u. Mitarb., 1950; FÜSSER u. KRUGER, 1951; BRAND u. MEHLMANN, 1953; JONES, 1961, und VAN DER KOLK, 1976, oder in einer Übersicht bei NOPP, 1974). Wasserschnecken ausgetrockneter Tümpel zeigen Aestivationsperioden, wie sie auch für Landschnecken beschrieben werden (s. u.). Königinnen von *Macrotermes sp.* (Termitide) sind auf Grund des geringen Sauerstoffgehaltes ihrer Kammer zumindest teilweise zu anaerobem Stoffwechsel gezwungen (BORDEREAU, 1976). Auch für überwinternde Käfer und einige Chelizeraten wurde eine beträchtliche Anaerobiosefähigkeit nachgewiesen (MASSARO, 1970; CONRADI-LARSEN u. SØMME, 1973; SØMME, 1974; FALKOWSKY, 1974, und PRESTWICH u. ING, 1982).

Für aestivierende Landpulmonaten wurde schon von HESSE (1910) eine, zumindest partielle, Anaerobiosekapazität angenommen. Die ökologische Bedeutung dieser durch respiratorische Messungen (SCHMIDT-NILSEN u. Mitarb., 1974; KRATOCHWIL, 1976) und den Nachweis offensichtlich anaerob gebildeter Endprodukte (VAN DER KOLK, 1976; VOGEL, 1983) weitgehend gesicherten Leistung liegt vermutlich primär im mit dem Aussetzen der Atmung verringerten Wasserverlust. Etwa derart, daß in der Mittagshitze jeder (aktive) Gasaustausch vermieden wird und die kühleren und feuchteren Nachtstunden zur Erholungsatmung ausgenützt werden können. Auch für im Boden überwinternde Arten ist (vor allem zur Zeit der Schneeschmelze und der damit verbundenen Überflutung) eine gewisse Anaeroberesistenz von Bedeutung (WIESER, 1981).

Im feucht-kühlen Klima des atlanto-mediterranen Gebietes ohne Winterschlaf überdauernde Helixarten, z. B. *H. aspersa,* schränken ihre Atmung stark ein und ätzen mit Hilfe der gebildeten Kohlensäure tiefe Löcher in die Kalkfelsen, auf welchen sie sitzen (KÜHNELT, 1932).

Auf eine Besonderheit zur Anaerobiose fähiger Mollusken sei hier besonders hingewiesen: Während bei vielen von ihnen anaerobe Stadien durch die Umweltbedingungen erzwungen werden, z. B. durch die drohende Austrocknung bei Ebbe, sind andere dazu fähig, unabhängig davon aerobe oder anaerobe Zustände herzustellen. Dies gilt z. B. von kalkätzenden Muscheln (z. B. Lithodomus, Petricola, Gastrochaena usw.), die anaerob erzeugte Kohlensäure und organische Säuren (z. B. Bernsteinsäure) zur Kalkätzung abscheiden, aber auch von Schnecken, die Schalenteile, welche das weitere Wachstum hindern können, auf anaerobem Wege wegätzen (z. B. Murex) (KÜHNELT, 1938).

Vorwiegend in den sauerstoffarmen bis weitgehend sauerstofffreien (SMITH, 1969) Darm- und Gallengängen von Vertebraten lebende Parasiten sind eine der am besten untersuchten Tiergruppen (Untersuchungen an Cestoden: AGOSIN u. REPETTO, 1964; SAZ u. Mitarb., 1972; KOEHLER u. HASELMANN, 1974; WATTS u. FAIRBAIRN, 1974; MOON u. Mitarb., 1977 a u. 1977 b; Trematoden: KOEHLER u. STAME, 1972; KRUGER u. Mitarb., 1978, und Nematoden: BUEDING, 1949; FAIRBAIRN, 1954; BUEDING u. FARROW, 1956; KMETEC u. BUEDING, 1961 u. 1965;

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.zobodat.at

REW u. SATZ, 1974; HARPUR u. JACKSON, 1975). Bei Endoparasiten eröffnet das Auftreten von vom Wirtsorganismus abweichenden Stoffwechselwegen eventuell therapeutische Möglichkeiten bei der Wurmbekämpfung (AGOSIN u. REPETTO, 1965).

Wie beim extrem belasteten Vertebratenmuskel ist auch bei vielen schnellschwimmenden Mollusken (Cephalopoden, Bivalvia) die ausreichende Versorgung mit Sauerstoff nicht immer möglich. An Stelle der Milchsäuregärung wurden bei Mollusken jedoch auch andere Reaktionsmechanismen gefunden (s. u.).

Auf die Situation bei Vertebraten kann hier nicht eingegangen werden. Es soll jedoch nicht unerwähnt bleiben, daß auch hier über die Lactatgärung hinausgehende Mechanismen gefunden wurden. Als Beispiel seien nur zwei neuere Untersuchungen an Fischen erwähnt (THILLART u. Mitarb., 1982, und WAARDE u. Mitarb., 1982), in denen auch die aktuelle Literatur, die Vertebratenanaerobiose betreffend, angeführt ist.

3. Mechanismen der anaeroben Bildung von End- bzw. Zwischenprodukten

Aufgabe des Sauerstoffs im aeroben Stoffwechsel ist es, die (weitgehend) vollständige Oxidation der Nahrungsstoffe zu ermöglichen. Sauerstoffmoleküle fungieren dabei als terminale Elektronenakzeptoren. Die Redoxbilanz kann so durch Reoxidation der beim oxidativen Nährstoffabbau reduzierten Cosubstrate (vorwiegend NAD^+) ausgeglichen werden. Dienen an Stelle von Sauerstoff in der Zelle gebildete organische Moleküle (oder Molekülteile) als terminale Elektronenakzeptoren, so ist die Oxidation der Nahrung nur bis zu einer weitaus geringeren Stufe möglich und dementsprechend die Energieausbeute um zirka eine Zehnerpotenz niedriger. Dennoch wird dieser Weg von zahlreichen Arten, zumindest fakultativ, beschritten.

Was sind nun die Eigenschaften, die von solchen Stoffwechselwegen zu erwarten sind?

a) Die Redoxbilanz muß in allen Fällen ausgeglichen sein (d. h. reduziertes NAD^+ muß reoxidiert werden).

b) Die Energieausbeute sollte möglichst groß sein (wie beschrieben, liegt sie dennoch in allen Fällen deutlich unter der aerob erreichbaren).

c) Akkumulierende Endprodukte sollten möglichst ungiftig sein, vor allem, wenn deren Ausscheidung unmöglich oder zumindest unökonomisch ist.

d) Bei fakultativen Anaerobiern wäre zu erwarten, daß die angehäuften Metaboliten bei neuerlichem Vorhandensein von Sauerstoff leicht weiter abgebaut oder erneut zu Speichersubstanzen synthetisiert werden können.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.zobodat.at

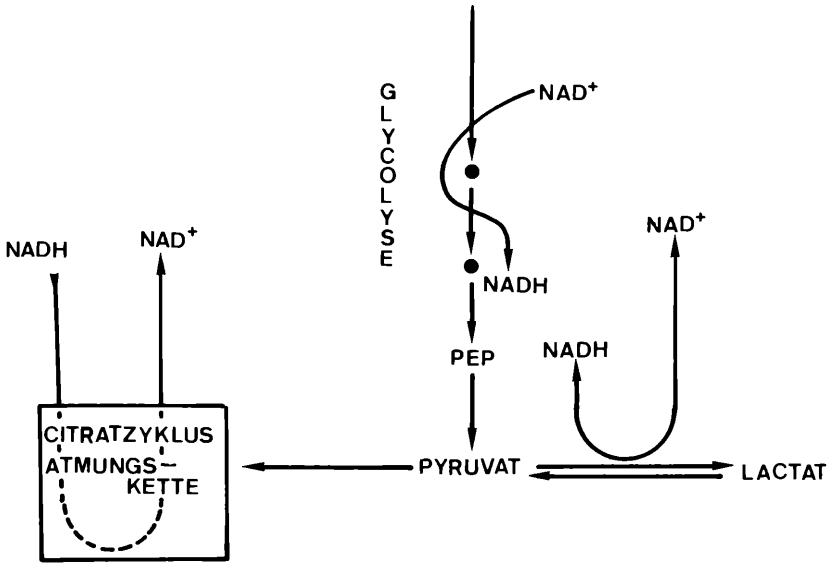


Abb. 1: Die Reoxidation von glycolytisch gebildetem NADH unter aeroben (nach links) und anaeroben (nach rechts) Bedingungen.

War es noch Anfang der siebziger Jahre möglich, unter Summierung der bekannten Daten Schemata mit dem Anspruch weitgehend allgemeiner Gültigkeit zu entwerfen, so scheint dies zur Zeit ausgeschlossen zu sein. Zu unterschiedlich sind die inzwischen erhobenen Befunde. Nicht nur systematisch nahestehende Arten, auch verschiedene Gewebe ein und derselben Art zeigen oft beträchtliche Divergenz ihrer Adaptationsmechanismen (z. B. Mantel und Adductormuskel von *Mytilus,* LIVINGSTONE u. BAYNE, 1977). Darüber hinaus wurden auch von der Form der Anaerobioseadaptation abhängige Unterschiede (z. B. zwischen luftexponierten und im O_2-freien Seewasser inkubierten *Mytilus,* KLUYTMANS u. Mitarb., 1977; ZUBURG u. KLUYTMANS, 1980; in N_2 oder in normaler Atmosphäre aestivierende *Helix,* VOGEL, 1983) sowie deutliche jahreszeitliche Schwankungen gefunden (*Mytilus* bildet unter Anaerobiose im Sommer hauptsächlich Propionat, im Winter keines, KLUYTMANS u. Mitarb., 1980).

Wenn auch aus den genannten Gründen kein allgemeingültiges Anaerobioseschema abgeleitet werden kann, so zeigen sich doch gewisse Gesetzmäßigkeiten. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über den Stand der Untersuchungen gegeben werden – wenngleich dies nur streiflichtartig und auf Teilkomplexe bezogen möglich ist.

Bis zur Stufe des Phosphoenolpyruvat (PEP) stimmen die postulierten Wege anaeroben Kohlenhydratabbaus, sieht man von Hinweisen auf eine quantitativ allerdings unbedeutende Beteiligung des Pentosephos-

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.zobodat.at

phatzyklus bei *Echinococcus* ab (AGOSIN u. REPETTO, 1965), mit der Reaktionsfolge der klassischen Glycolyse überein. Die Reaktion von Phosphoenolpyruvat, um das (in Richtung Abbau) zwei Enzyme konkurrieren, könnte eine der Schaltstellen von aeroben zum anaeroben Metabolismus sein. Ausgehend vom PEP wird entweder – der klassischen Glycolyse folgend – Pyruvat gebildet oder, und diese Möglichkeit scheint bei fakultativen Anaerobiern im größeren Ausmaß verwirklicht zu sein, es erfolgt die Carboxylierung zu Oxalacetat.

3.1. Lactat

Bei der Milchsäuregärung, wie sie vor allem bei Vertebratenmuskeln untersucht wurde, wird anaerob im letzten, von der Lactatdehydrogenase (LDH) katalysierten Schritt das vorher verbrauchte NAD^+ regeneriert. Lactat wird bei Abwesenheit von Sauerstoff angereichert. Steht O_2 erneut zur Verfügung, so kann Lactat über Pyruvat weiter abgebaut werden (Abb. 1). Bei den daraufhin untersuchten Evertebraten wurde außer einer (in vielen Fällen allerdings kaum aktiven) L-LDH auch die für die stereoisomere D-Form spezifische D-LDH gefunden. Auch wurde die Bildung oft sehr großer Mengen D-Lactat nachgewiesen (bei Chironomidenlarven: WILPS u. ZEBE, 1976; Araneae: PRESTWICH u. ING, 1982; *Cardium:* GÄDE, 1980; MEINARDUS u. GÄDE, 1981; *Nereis:* SCHÖTTLER, 1978; *Helix:* WIESER u. WRIGHT, 1978; VOGEL, 1983).

Der biologische Nutzen im Auftreten beider Stereoisomere liegt möglicherweise in einer erweiterten Regulationsmöglichkeit durch das (in Richtung Pyruvat gegebene) Vorliegen zweier Substrate.

Kaum LDH und dementsprechend auch nur eine sehr geringe Lactatanreicherung zeigen z. B. *Tubifex* (SCHÖTTLER u. SCHROFF, 1976) und *Mytilus* (DE ZWAAN u. ZANDEE, 1972).

Sowohl LDH als auch Octopindehydrogenase (ODH, s. u.) liegen in Form unterschiedlicher Isoenzyme vor. Ähnlich den Verhältnissen bei der LDH von Vertebraten konnten bei *Sepia* beide Enzyme mit kinetischer Präferenz in Richtung Pyruvat (entspr. dem H-Typ der Vertebraten-LDH) und in Richtung Lactat bzw. Octopin (entspr. M-Typ) gefunden werden (STOREY, 1977). Der Autor untersuchte auch die gewebsspezifische Verteilung und fand ein der Vertebraten-LDH analoges Enzymmuster. Weitere Untersuchungen ergaben, daß es zwischen beiden Enzymen kaum zur Konkurrenz kommt. In Muskelgeweben übertrifft die Aktivität der (M-Typ) ODH jene der (M-Typ) LDH bei weitem. Dementsprechend werden auch im Gegensatz zu Octopin nur geringe Mengen Lactat gebildet. In den „aeroben" Geweben wie Herz, Hepatopankreas und Gehirn liegen beide Dehydrogenasen (als H-Typ) vor. Die Substrate sind hier jedoch für beide Enzyme verschieden, Octopin bzw. Lactat. Beide Enzyme ergänzen einander bei der Bildung von Pyruvat.

WIESER und WRIGHT (1978) fanden bei *Helix pomatia* Hinweise auf das Vorliegen von 5 Isoenzymen einer D-Lactat spezifischen Dehydro-

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.zobodat.at

genase. Ebenfalls 5 Isoenzyme mit gewebsspezifischer Verteilung wurden bei *Biomphalaria glabrata* (einer Lungenschnecke) gefunden (NARANG, 1974). Der Autor nimmt für *Biomphalaria* die Existenz zweier Isoenzymmonomeren mit nach dem Zufallsprinzip ablaufender Tetramerenbildung an.

3.2. Octopin (N-2-[D-1-Carboxyethyl]-L-Arginin)

Bei Cephalopoden, aber auch bei zahlreichen anderen Mollusken wird Lactat ganz oder teilweise durch Octopin ersetzt (*Nautilus:* HOCHACHKA u. Mitarb., 1976; *Sepia:* STOREY, 1977; STOREY u. STOREY, 1979; *Loligo:* GRIESHABER u. GÄDE, 1976; *Plactopecten:* DE ZWAAN u. Mitarb., 1980; LIVINGSTONE u. Mitarb., 1981; *Pecten:* GRIESHABER u. GÄDE, 1977; GÄDE u. Mitarb., 1978; BALDWIN u. OPIE, 1978; *Cardium:* GÄDE u. ZEBE, 1973; GÄDE, 1975 u. 1980; GÄDE u. GRIESHABER, 1976). Octopindehydrogenasen wurden ferner für *Mytilus, Anodonta, Unio* und *Dreissena* nachgewiesen (GÄDE u. ZEBE, 1973; DE ZWAAN u. Mitarb., 1982).

Keine Octopinbildung bzw. keine Octopindehydrogenaseaktivität wurde bei *Limaria fragilis* (BALDWIN u. LEE, 1979) und bei *Mya arenaria* (GÄBE u. ZEBE, 1973) gefunden.

Octopindehydrogenase (ODH) oxidiert wie LDH NADH zu NAD^+ und vermag dadurch ebenso die Redoxbilanz auszugleichen. Arginin kondensiert dabei mit Pyruvat zu Octopin (s. Abb. 2).

Untersuchungen am partiell gereinigten Enzym aus *Pecten maximus* zeigen eine relativ eingeschränkte Substratspezifität des Enzyms (Voraussetzung ist eine $-NH_2$) und eine Guanidingruppe bei einem der Reaktionspartner, im Falle der Ketosäure ist mehr Spielraum gegeben.

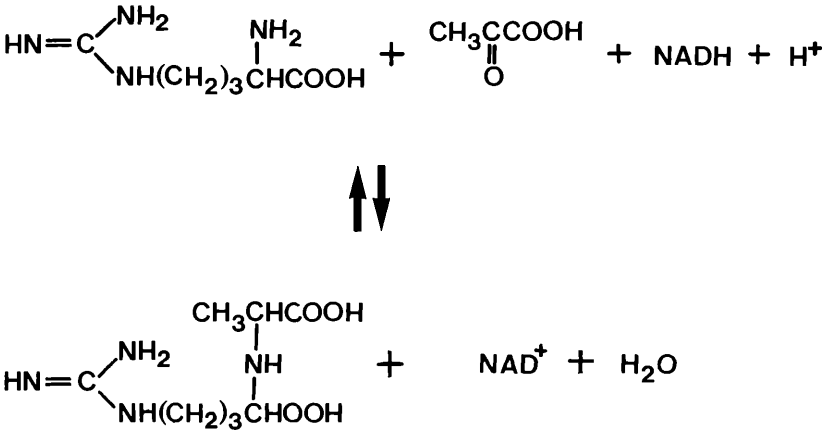


Abb. 2: Die Bildung von Octopin: Arginin + Pyruvat + NADH + $H^+ \rightarrow$ Octopin + NAD^+ + H_2O.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.zobodat.at

Die Reaktion ist frei reversibel (THOAI u. ROBIN, 1959 u. 1961; ROBIN u. THOAI, 1961). Bemerkenswert ist die Enzymaktivität, sie übersteigt bei *Loligo* das Sechsfache der Glyzerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase und das 365fache der hier allerdings kaum aktiven LDH (GRIESHABER u. GÄDE, 1976).

Octopinsynthese tritt meist bei Arten mit spontan sehr hohem Energieverbrauch auf (Flucht, Verfolgung). Hier scheint ein schon von THOAI und ROBIN (1959) vermuteter Zusammenhang zwischen anaerober Glycolyse und Phosphagenverbrauch zu bestehen. Das bei Muskelarbeit aus Argininphosphat (dem Phosphagen der Mollusken) freiwerdende Arginin wirkt für den Organismus giftig, während das Kondensationsprodukt mit Pyruvat, Octopin auch in höheren Konzentrationen keinerlei störenden Einfluß auf das Stoffwechselgeschehen hat (BOWLUS u. SOMERO, 1979).

Bei *Buccinum undatum* (KOORMANN u. GRIESHABER, 1980) sowie bei einigen anderen daraufhin untersuchten Arten wird ATP bei anaerober Muskelaktivität durch synchron verlaufende Substratketten-Phosphorylierung und Phospho-L-Argininspaltung regeneriert. Nur bei den sehr „schnell" flüchtenden *Pecten maximus* (GÄDE u. Mitarb., 1978) und *Clamys sp.* (GRIESHABER, 1978) tritt eine Octopinanreicherung (und ein damit verbundener Argininabbau) erst mit Beginn der Erholungsphase ein, was für einen kurzfristig vor allem auf Phosphagenabbau angewiesenen Energiestoffwechsel bei den genannten Arbeiten spricht. Bei *Cardium edule* wird nicht nur nach Muskelarbeit, sondern auch nach längerer Inkubation in O_2-freiem Seewasser (unter anderem) eine Anreicherung von Octopin und Arginin, verbunden mit einer fast völligen Erschöpfung der Phosphagenreserven, gefunden (MEINARDUS u. GÄDE, 1981).

Auch für die schwimmende *Placopecten* konnte die Abnahme von Phosphoarginin sowie eine damit verbundene Zunahme der Octopinkonzentration gezeigt werden (LIVINGSTONE u. Mitarb., 1981). Bei daraufhin untersuchten Individuen von *Helix aspersa* wurde keinerlei Octopindehydrogenaseaktivität gefunden (unpubl. zit. bei WIESER u. WRIGHT, 1978).

3.3. Alanopin, Strombin und Ornithin

Octopindehydrogenase, ein ausführlich untersuchtes und charakterisiertes Enzym (s. o.), ist nicht die einzige die Bildung einer Iminosäure katalysierende Dehydrogenase, welche bei Invertebraten die Lactatdehydrogenase zu ersetzen vermag. Die Reaktion:

$$\text{Pyruvat} + \text{Aminosäure} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Iminosäure-} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$$

wird auch von Alanopindehydrogenase bzw. Strombindehydrogenase katalysiert.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.zobodat.at

Pyruvat + Alanin + NADH + H^+ → Alanopin (2,2-Iminopropionsäure + NAD^+ + H_2O

Pyruvat + Glycin + NADH + H^+ → Strombin (2-Methyliminodi-Essigsäure) + NAD^+ + H_2O

Leider ist die Enzymnomenklatur hier noch sehr unsicher. Ein die reduktive Kondensation von Alanin mit Pyruvat katalysierendes Enzym wurde zum ersten Mal im Muskelgewebe von *Crassostrea gigas* (FIELDS, 1976) festgestellt. Dieses als Alanopindehydrogenase bezeichnete Enzym zeigt eine breite Substratspezifität. Es katalysiert neben der Kondensation mit Alanin auch jene mit Glycin, und zwar mit teilweise noch größerer Aktivität. Das von PLAXTON u. STOREY (1982) aus *Littorina littorea* isolierte Enzym hingegen ist streng spezifisch (auch in bezug auf die sterische Konfiguration). Andere Amino- bzw. Ketosäuren werden wesentlich langsamer umgesetzt und/oder zeigen einen unphysiologisch hohen K_m-Wert.

Gleiches gilt für die Alanopindehydrogenase aus *Busycotypus canaliculatum* (PLAXON u. STOREY, 1982 b). Mittlerweile werden von den meisten Autoren Enzyme vom Typ der Auster, welche vor allem Glycin als Substrat akzeptieren, als Strombindehydrogenase bezeichnet (DE ZWAAN u. ZUBURG, 1981; DANDO u. Mitarb., 1981; DANDO, 1981; alle zit. nach PLAXTON u. STOREY, 1982 a).

Die Produkte beider Reaktionen, Alanopin und Strombin, werden, wie auch für Octopin gezeigt, bevorzugt unter anaeroben Bedingungen gebildet (COLLICUT u. HOCHACHKA, 1977; FIELDS, 1976; DE ZWAAN u. ZUBURG, 1981). Auch hier liegt die Bedeutung der Reaktion wahrscheinlich im Ausgleich der glycolytischen Redoxbilanz.

Pulmonaten scheinen über einen anderen Mechanismus zu verfügen, über welchen ebenfalls das bei der Phosphagenspaltung gebildete Arginin umgewandelt und damit entgiftet werden kann. Bei künstlich induzierter Anaerobiose (N_2-Atmosphäre) sinkt die Konzentration von Phosphorarginin. Im Gegensatz zur erwarteten Konzentrationszunahme von Arginin zeigt sich hier ebenfalls ein Konzentrationsrückgang (WIESER u. PLATZER, 1983). Die Autoren konnten bei inaktiven Individuen eine, der Summe von Arginin- und Argininphosphatverbrauch entsprechende Ornithinbildung nachweisen. Auch das die Ornithinbildung (aus Arginin) katalysierende Enzym, die Arginase, konnte mit hoher Aktivität nachgewiesen werden.

Arginase

Arginin → Ornithin + Harnstoff

Ornithin vermag demnach Octopin, soweit es sich um eine Entgiftungsreaktion handelt, zu ersetzen. Wenn der freigesetzte Harnstoff jedoch als Ammoniakquelle für eine reduktive Aminierung dient, wäre auch eine Beteiligung am Ausgleich der Redoxbilanz denkbar.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.zobodat.at

3.4. Aspartat

Bei Anneliden und Mollusken konnte zumindest für bestimmte Gewebe neben dem Abbau von Kohlenhydrat auch eine Beteiligung von Aspartat am anaeroben Energiestoffwechsel gezeigt werden (*Arenicola:* ZEBE, 1975; FELDBECK, 1980; *Nereis:* SCHÖTTLER, 1978; *Crassostrea* (Herz): COLLICUT u. HOCHACHKA, 1977; *Modiolus:* BAGINSKY u. PIERCE, 1978; *Placopecten:* DE ZWAAN u. Mitarb., 1980; *Helix:* VOGEL, 1983). Im Unterschied zu den übrigen Aminosäuren, deren Konzentration beim Übergang zu hypoxischen Bedingungen annähernd konstant bleiben bzw. bei Alanin ansteigen, zeigt sich bei den genannten Arten ein deutlicher Aspartatabbau. Die Frage nach dem Weg des Aspartatmoleküls im Stoffwechsel muß für Aminogruppen und Kohlenstoffskelett getrennt beantwortet werden.

3.4.1. Das Kohlenstoffskelett von Aspartat

Für Aspartat wurde die Verkürzung um ein Kohlenstoffatom (zu Alanin) sowie die Umwandlung in Metaboliten des Citratzyklus gezeigt. Die Bildung von Alanin aus Aspartat-Kohlenstoff ließ sich für *Arenicola* (ZEBE, 1975; FELDBECK, 1980), *Rangia* (STOKES u. AWAPARA, 1968) und – nicht ganz so deutlich – für *Crassostrea* (COLLICUT u. HOCHACHKA, 1977) mittels Radiotracing (14C-Aspartat) sowie indirekt bei *Mytilus* (DE ZWAAN u. Mitarb., 1982, durch Blockieren der Glycolyse (mit Jodo-Acetat) beweisen.

Aspartat könnte

a) nach der Transaminierung zu Oxalacetat über die PEPCK und die PK verkürzt und anschließend zu Alanin transaminiert werden,
b) nach der Bildung von Oxalacetat und Reduktion zu Malat (Malatdehydrogenase – MDH) decarboxyliert und anschließend transaminiert werden,
c) mittels Pyruvatcarboxylase verkürzt und anschließend ebenfalls zu Alanin transaminiert werden.

Die Bildung von Metaboliten des Citratzyklus:

Aspartat kann, nach Abgabe der Aminogruppe als Oxalacetat zu Malat reduziert, oder wie beschrieben (s. u.) und schematisch dargestellt (Abb. 3), über den Purin-Nucleotid-Zyklus zu Fumarat reduziert und dehydratisiert werden. Nach anaerober Inkubation mit 14C-Aspartat findet sich der größte Teil der Radioaktivität (abgesehen von der bereits erwähnten Markierung von Alanin) in Succinat (bzw. Propionat) und teilweise auch in Malat. (*Arenicola:* ZEBE, 1975; FELDBECK, 1980; *Crassostrea:* COLLICUT u. HOCHACHKA, 1977). Markiertes Malat tritt nur nach kurzfristiger anaerober Inkubation auf und kommt daher wohl nur als Zwischenprodukt in Frage (FELDBECK, 1980). Über weitere Reaktionen von Malat im Citratzyklus siehe Abschnitt 3.7.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.zobodat.at

3.4.2. Der Weg der Aminogruppe von Aspartat

Der häufig gefundenen Korrelation von Aspartat-Abnahme und Alanin-Zunahme liegt, wenn man von den Fällen absieht, bei welchen die Herkunft des Alanin-Kohlenstoffskelettes aus Aspartat nachgewiesen ist (s. o.), wahrscheinlich ein Transfer der Aminogruppe von Aspartat auf Pyruvat zugrunde. Da ein Enzym, welches diese NH_2-Gruppenübertragung direkt katalysiert nicht bekannt ist, werden mehrstufige Mechanismen diskutiert.

1. Die Abspaltung von Ammoniak aus Aspartat über den Purin-Nucleotid-Zyklus (PN-Zyklus); die Bildung von Fumarat:

Alle am PN-Zyklus beteiligten Enzyme konnten in *Helix aspersa* nachgewiesen werden (CAMPELL u. VORHABEN, 1979). *Mytilus edulis* zeigt bei Hemmung der Adenylsuccinat-Synthetase mittels Hadacidin in vitro keine Änderung bei der Alaninsynthese, eine nennenswerte Beteiligung des PN-Zyklus scheint hier ausgeschlossen (DE ZWAAN u. Mitarb., 1982). Für die Bildung von Alanin aus Pyruvat hat DE ZWAAN (1971, zit. nach ZUBURG u. DE ZWAAN, 1981) zwei Möglichkeiten vorgeschlagen:

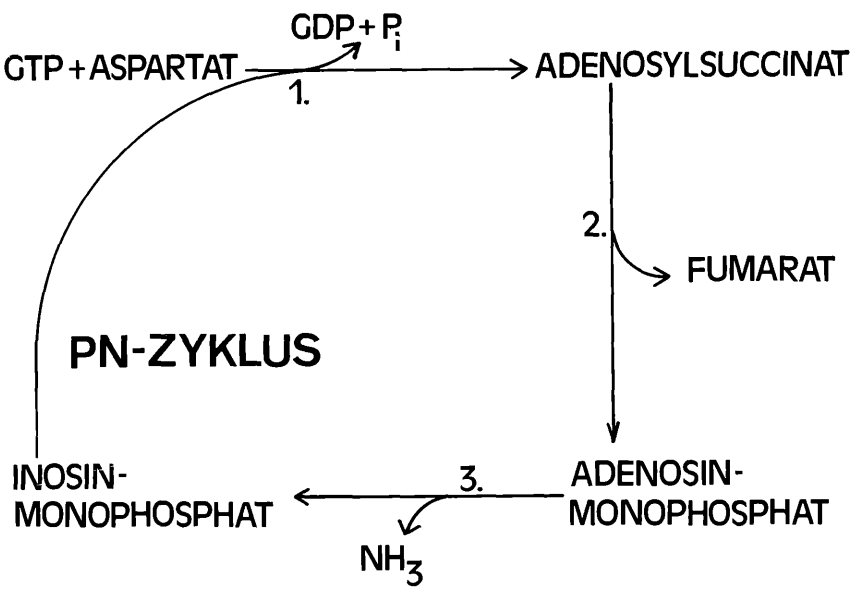


Abb. 3: Der Purin-Nucleotid-Zyklus (PN-Zyklus).

Summe der Reaktionen:
Aspartat + GTP + H_2O → Fumarat + NH_3 + GDP + P_i

Enzyme:	Adenosylsuccinat (EC 6.3.4.4.)	Reaktion 1
	Adenosylosuccinatylase (EC 4.3.2.2.)	Reaktion 2
	AMP-Deaminase (EC 3.5.4.6.)	Reaktion 3

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.zobodat.at

a) mit Alanindehydrogenase:

Glc-6-P + 2 NAD^+ → 2 Pyruvat + 2 NADH

2 NH_3 + 2 Pyruvat + 2 NADH → 2 Alanin + 2 NAD^+ + 2 H_2O

b) mittels des Glutamat-Pyruvat-Transaminase/Glutamat-Dehydrogenase-Komplexes:

Glc-6-P + 2 NAD^+ → 2 Pyruvat + 2 NADH

2 Pyruvat + 2 Glutamat → 2 Alanin + 2 2-Ketoglutarat (2-KG)

2 NH_3 + 2 2 KG + 2 NADH → 2 Glutamat + 2 NAD^+ + H_2O

Nettoreaktion in beiden Fällen:

2 NH_3 + Glc-6-P → 2 Alanin

Wie zu sehen ist, kann mit beiden Reaktionsfolgen die Redoxbilanz der Glycolyse ausgeglichen werden. Die Triosephosphatbildung wurde bei obigem Schema nicht berücksichtigt. Bei daraufhin untersuchten Arten konnte, wenn auch mit geringer Aktivität der Enzyme GTP und (allerdings nicht bei allen) GDH, nicht jedoch ADH nachgewiesen werden (Lit. zit. bei ZUBURG u. DE ZWAAN, 1981). LIVINGSTONE u. Mitarb. (1979) sowie HENRY u. Mitarb. (1980) halten nach Untersuchungen an *Mytilus* bzw. *Rangia* die Alanindehydrogenasereaktion für den wichtigsten Ammoniakfixierungsmechanismus bei Bivalven. In beiden Fällen war jedoch der Nachweis indirekt, und alternative Wege sind nicht auszuschließen.

Bei Gastropoden werden geringe Aktivität der GDH, bei *Helix aspersa* fast ausschließlich in den Mitochondrien lokalisiert, gefunden. Die Enzymaktivität bei Desaminierung beträgt für *H. aspersa* nur etwas mehr als ein Zehntel der in Richtung Glutaminsynthese gemessenen und macht eine Ammoniakfixierung auf diesem Weg unwahrscheinlich (SOLLOCK u. Mitarb., 1979). Bei der gleichen Art konnten CAMPELL u. VORHABEN (1979) mittels Zugabe von Glutamat (bzw. von Glutamin) bei Mitochondrienpräparaten keine Erhöhung des Sauerstoffverbrauches induzieren, was bei Vorliegen von Desaminierungsreaktionen der Fall sein sollte.

2. Ohne Abspaltung von NH_3; Transaminierungsreaktionen: Hohe Aktivitäten beider (s. u.) Transaminasen wurden in Gastropoden festgestellt (SOLLOCK u. Mitarb., 1979). Für *Mytilus* nehmen DE ZWAAN u. Mitarb. (1982) ausschließlich Transaminierungsreaktionen an.

Aspartat + 2-Ketoglutarat → Oxalacetat + Glutamat (1)

Glutamat + Pyruvat → Alanin + Oxalacetat (2)

Netto: Aspartat + Pyruvat → Alanin + Oxalacetat

Enzyme: (1) Glutamat-Oxalacetat-Transaminase

(2) Glutamat-Pyruvat-Transaminase

Während ZEBE (1975) bei *Arenicola* keine nennenswerte Umwandlung von 14C-Glutamat fand, konnte FELDBECK (1980) mit 15N-Aspartat eine Beteiligung von Glutamat-Stickstoff an der Alaninbildung bei gleichzeitig konstantem Glutamatgehalt zeigen. Der bei den meisten

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.zobodat.at

Arten unverändert hohe Glutaminspiegel könnte als Pool für Transaminierungsreaktionen dienen. Wie Abb. 4 zeigt, kann die Kopplung von Alaninbildung und Aspartatverbrauch (diese ist nicht streng stöchiometrisch, meist übersteigt die Alaninbildung deutlich den Aspartatverbrauch) auch (oder zusätzlich) über den Ausgleich der Redoxbilanz verlaufen.

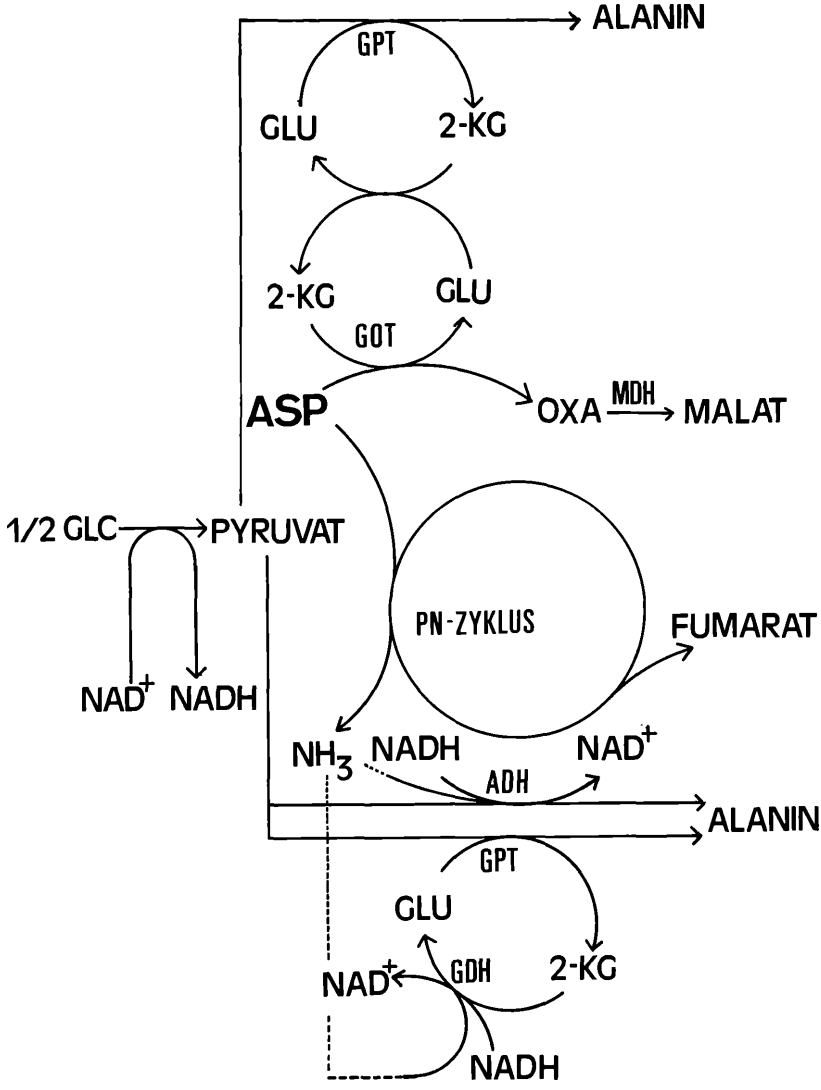


Abb. 4: Reaktionen der Aminogruppe von Aspartat (hypothetisch).

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.zobodat.at

3.5. Alanin, andere Aminosäuren

Alanin ist, zumindest initial, ein unter Anaerobiose häufig gebildetes Endprodukt (z. B.: Plathelminthen: MCMANUS u. JAMES, 1975; Anneliden: FELDBECK, 1980; Mollusken: HOFFMANN u. Mitarb., 1979; DE ZWAAN u. Mitarb., 1982; VOGEL, 1983). Die Bildung von Alanin an Stelle von Lactat ist nicht mit höherer Energieausbeute verbunden. Die Aminosäure stört jedoch auch in hohen Konzentrationen kaum das übrige Stoffwechselgeschehen, wie anhand von Messungen der K_m und der Thermostabilität an verschiedenen Enzymen gezeigt werden konnte (BOWLUS u. SOMERO, 1979). Bei marinen Mollusken wurde Alaninbildung auch als osmotischer Adaptationsmechanismus nachgewiesen (BAGINSKY u. PIERCE, 1978; LIVINGSTONE u. Mitarb., 1979).

Wie Abb. 4 zu entnehmen ist, kann mittels Alaninbildung die glycolytische Redoxbilanz nur dann ausgeglichen werden, wenn die Reaktion unter Ammoniakfixierung (Alanin- oder Glutamatdehydrogenasereaktion) verläuft. Wird Ammoniak erst bei Anaerobiose durch oxidative Desaminierung gebildet, so ist die Gesamtreaktion (oxidative Desaminierung und reduktive Aminierung) ihrerseits redoxbilanzmäßig ausgeglichen, der in der Glycolyse gebildete NADH-Überschuß bleibt bestehen. Wird Ammoniak jedoch aus Aspartat über den PN-Zyklus freigesetzt (Abb. 3), was von der NAD^+/NADH-Bilanz her neutral, aber mit Energieverbrauch verbunden ist, so kann die anschließende reduktive Aminierung von Pyruvat NAD^+ regenerieren.

Die Herkunft des Alanin-Kohlenstoffskelettes wurde, wie auch Abb. 5 zeigt, sowohl aus Glucose (STOKES u. AWAPARA, 1968; ZEBE, 1975 u. a.) als auch aus Aspartat gefunden.

Für die Bildung der Aminogruppe ist eine Beteiligung von Aspartatstickstoff gefunden worden (s. 3.4.2.). Die Herkunft der weiteren Aminogruppen – der Aspartatabbau reicht bei weitem nicht aus – ist noch ungewiß, zumal die Konzentration der meisten übrigen Aminosäuren in der Anaerobiosesituation annähernd konstant bleibt, was auch gegen einen nennenswerten Abbau von Proteinen spricht.

Außer der Abnahme von Aspartat sowie der Bildung von Alanin (auch D-Alanin, FELDBECK, 1980) und von Iminosäuren (s. 3.2. und 3.3.) wurde noch bei einigen Arten eine Änderung der Glutamatkonzentration gefunden (z. B. *Mytilus:* DE ZWAAN u. Mitarb., 1975; LIVINGSTONE u. BAYNE, 1977; WIDDOWS u. Mitarb., 1979). Auch bei Arten mit konstantem, meist hohem Glutamatgehalt zeigt sich (z. B. nach Radiotracing mit 15N-Glutamat) eine hohe Umsatzrate der Aminosäure, wahrscheinlich eine Folge reger Transaminasetätigkeit. Eine Zunahme der Glutamatkonzentration ist so eher als eine Ausweitung des Transaminierungspools denn als Bildung von Glutamat als einem Endprodukt des anaeroben Stoffwechsels zu interpretieren.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.zobodat.at

3.6. Malat

Malat, nur in wenigen Fällen als Endprodukt anaeroben Stoffwechsels beschrieben (z. B. bei Spinnen, PRESTWICK u. ING, 1982), wird häufig als ein Zwischenprodukt anaerober Succinat- bzw. Propionatbildung angesehen. Durch Reduktion von Oxalacetat (oder durch Carboxylierung von Pyruvat) gebildet, vermag Malat durch die Mitochondrienmembran zu dringen, wo es durch die Enzyme des Citratzyklus weiter abgebaut wird.

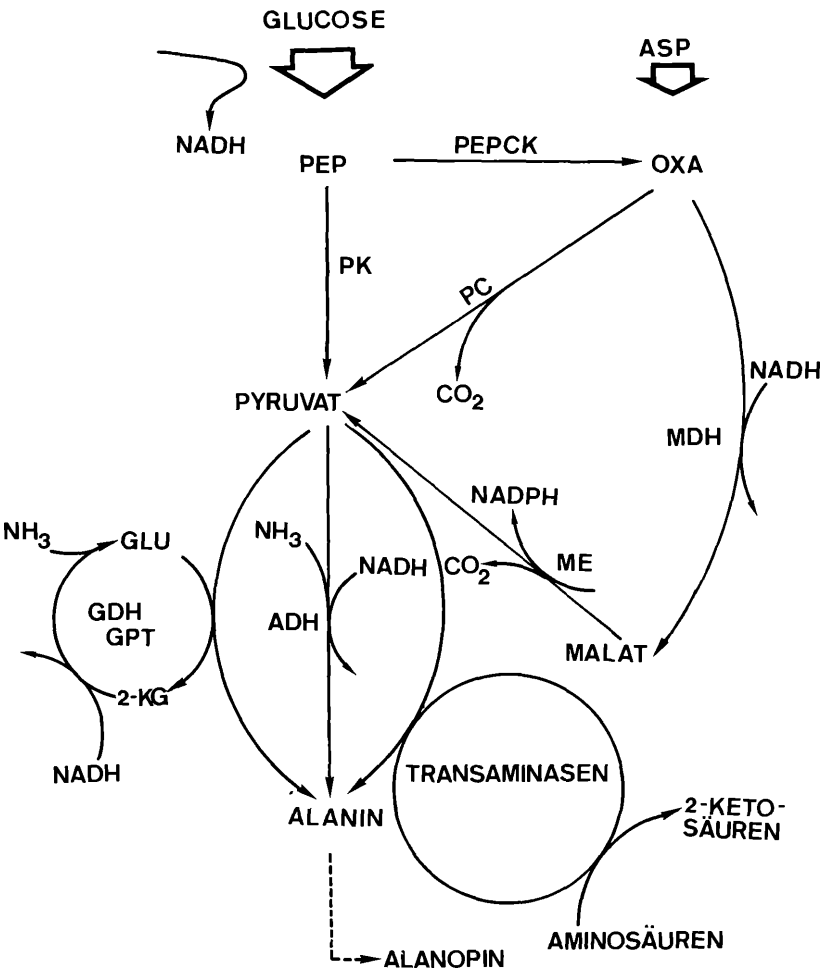


Abb. 5: Die Bildung von Alanin, Herkunft des Kohlenstoffskelettes (ohne Berücksichtigung von Phosphorylierungsreaktionen). Erläuterungen im Text.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.zobodat.at

Bei Evertebraten konnte die Herkunft von Malatmolekülen (durch Radiotracing mit 14C-Glucose, 14C-Aspartat bzw. durch Verbrauchsmessungen) aus Glucose für fast alle untersuchten Arten und aus Aspartat in einigen Fällen (s. 3.4. und 3.7.) gezeigt werden.

Geht man vom Kohlenstoffwechsel aus und zieht man die unter anderem für *Rangia cuneata* (STOKES u. AWAPARA, 1968), *Tubifex* (SCHÖTTLER, 1974, zit. bei ZEBE, 1975) und *Arenicola marina* (ZEBE, 1975) mit 14 CO_2 nachgewiesenen Carboxylierungsreaktionen in Betracht, so sind es zunächst 4 Reaktionen, die für den Ausbau der 4C-Körper in Frage kommen.

a) Pyruvat + CO_2 + ATP (CTP) + H_2O → Oxalacetat + ADP (CDP) + Pi
Enzym: Pyruvatcarboxylase (PC)

b) PEP + CO_2 → Oxalacetat + Pi
Enzym: Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEPC)

c) Pyruvat + NADPH + H^+ + CO_2 → Malat + $NADP^+$
Enzym: Malat-Enzym (ME)

d) PEP + IDP (GDP) + CO_2 → Oxalacetat + ITP (GTP)
Enzym: Phosphoenolpyruvatkarboxykinase (PEPCK)

Die von der PC katalysierte Reaktion a ist wegen des damit verbundenen ATP-Verbrauches in der energetisch problematischen Anaerobiosesituation sehr unwahrscheinlich. Bei den meisten der daraufhin untersuchten Arten konnte das Enzym auch nicht in nennenswerter Menge nachgewiesen werden (Untersuchungen an *Echinococcus,* AGOSIN u. REPETTO, 1965, und an *Arenicola,* WIENHAUSEN, 1976, zit. bei SCHÖTTLER, 1980). Geringe PC-Aktivitäten wurden bei *Mytilus ed.* vor allem in den Mitochondrien gefunden (DE ZWAAN u. Mitarb., 1973).

Für Reaktion b gilt derselbe Einwand. Eine einfache Abspaltung vom sehr energiereichen Phosphatester käme einer Verschwendung von ATP gleich. Auch dieses Enzym wurde nicht mit relevanter Aktivität gefunden (Untersuchungen z. B. bei *Echinococcus,* AGOSIN u. REPETTO, 1965).

Bleiben noch die Reaktionen c und d. Beide werden von allgemein sehr weit verbreiteten Enzymen katalysiert. PEPCK ist in Richtung PEP ein Enzym der Gluconeogenese, und Malat-Enzym liefert mit der Oxidation von Malat zu Pyruvat die zur Fettsäuresynthese benötigten Reduktionsäquivalente (NADPH).

AGOSIN und REPETTO (1965) nehmen auf Grund des zeitlichen Aktivitätsmusters von Produkten aus 14C-Glucose und $14CO_2$ bei Echinococcus eine Carboxylierung über das Malat-Enzym an, ohne jedoch einen Reaktionsverlauf über die PEPCK ausschließen zu können. SCHÖTTLER (1980) und SCHÖTTLER u. WIENHAUSEN (1981) konnten durch Hemmung von PEPCK mittels 3-Merkapto-Picolinsäure nachweisen, daß der weitaus größte Teil der Succinatproduktion bei *Arenicola* und *Nereis* über dieses Enzym verläuft. Unter dem Einfluß des Hemmstoffes

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.zobodat.at

wird an Stelle von Succinat, Propionat oder Acetat (!) Lactat gebildet. Lactat kommt sonst bei *Arenicola* nicht vor (DALES, 1968). Bei *Tubifex*, einem Oligochäten, der ebenfalls Succinat bzw. Acetat anreichert, ist die PEPCK bei Anaerobiose maximal aktiv, während die PK weitgehend gehemmt ist. Auch weisen die katalytischen Parameter (Affinität, Produkthemmung) für MDH auf eine Decarboxylierungsreaktion in Richtung Pyruvat hin (HOFFMANN u. Mitarb., 1979).

Desgleichen sprechen auch die kinetischen Daten der MDH vom Adductor-Muskel der Auster *(Crassostrea)* gegen eine CO_2-Fixierung an dieser Stelle (HOCHACHKA u. MUSTAFA, 1973). Die Lokalisierung von PEPCK in typisch glycolytischem Gewebe wie dem Adductor-Muskel von Muscheln (DE ZWAAN u. MARREWIJK, 1973; MUSTAFA u. HOCHACHKA, 1973) widerspricht auch einer vorwiegend anabolischen Reaktionsweise des Enzyms und deutet ebenso auf eine Beteiligung am anaeroben Energiestoffwechsel hin wie auch eine auffällig hohe Aktivität des Enzyms (oft auch im Vergleich mit der PK) bei Arten mit hoher Anaerobiosekapazität (z. B. *Rangia:* SIMPSON u. AWAPARA, 1964 u. 1966; *Dicrocoelium:* KÖHLER, unpubl., zit. bei KÖHLER u. STAMPE, 1972; *Mesocestoides:* KÖHLER u. HASELMANN, 1974; *Limolus:* FALKOWSKY, 1974).

3.6.1. Reaktionen von PK und PEPCK

Bei Anwesenheit von Sauerstoff und bei anaerober Milchsäuregärung wird PEP mittels PK zu Pyruvat abgebaut. Bei dieser irreversiblen (G^{01} = –7,5 kcal) Reaktion wird ATP gebildet.

PEP + ADP → Pyruvat + ATP

Der alternative, für die anaerobe Bildung von Succinat (bzw. Propionat) erstmals von SIMPSON und AWAPARA (1966) angenommene Weg ist die Carboxylierung von PEP zu Oxalacetat. Diese, mit der vorherigen energetisch gleichwertige Reaktion wird von der PEPCK katalysiert.

PEP + CO_2 + IDP (GDP) → Oxalacetat + ITP (GTP)

Die Eigenschaften der beiden genannten Enzyme wurden ausführlich von HOCHACHKA und MUSTAFA (Zusammenfassung: HOCHACHKA und MUSTAFA, 1972) an Austern untersucht. Nach diesen Arbeiten zeigen die konkurrierenden Enzyme einander ausschließende pH-Profile. Die PK wäre demnach nur im alkalischen (pH = 7,5–8,5), die PEPCK nur im sauren (pH = 5–6) Bereich aktiv. Die Autoren vermuten, mit dieser pH-Abhängigkeit den primären Umschaltmechanismus gefunden zu haben. Durch anaerobiosebedingtes Absinken des intrazellulären pH (Anreicherung organischer Säuren, CO_2) wird demnach, beim Fehlen anderer Faktoren, die PK blockiert und die PEPCK aktiviert. Eine derartig ausgeprägte pH-Abhängigkeit hat sich allerdings nicht bestätigt, auch wird das von den Autoren geforderte Absinken des pH auf 6 und niedriger angezweifelt (z. B. DE ZWAAN u. DE BONT, 1975, sowie DE ZWAAN, 1977).

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.zobodat.at

Nach neueren Untersuchungen scheint ein Absinken des pH nicht oder zumindest nicht ausschließlich für ein Umschalten von PK auf PEPCK verantwortlich zu sein. Bei *Mytilus galloprovincialis* und *M. edulis* liegen die Optima annähernd gleich (VOOYS, 1980), und bei *Helix aspersa* scheint das Aktivitätsmaximum der PEPCK, verglichen mit dem der PK, sogar im etwas alkalischeren Bereich zu liegen (NOPP u. Mitarb., 1981). Hier stellt jedoch die geringe Aktivität der PEPCK eine entscheidende Bedeutung des Enzyms im Stoffwechsel überhaupt in Frage. Es scheint, daß kein strikter entweder/oder-Mechanismus besteht, sondern daß, je nach Vorhandensein, oder auch bei völliger Abwesenheit von Sauerstoff, beide Enzyme gleichzeitig tätig sein können (LIVINGSTONE u. BAYNE, 1974; MCMANUS u. JAMES, 1975; LIVINGSTONE, 1978).

Die Regulationsmechanismen um die PK und PEPCK erwiesen sich als außerordentlich komplex, was die Interpretation von In-vitro-Untersuchungen erschwert. Die Aktivität und zum Teil auch die pH-Abhängigkeit beider Enzyme wird vom Vorhandensein bivalenter Kationen, vor allem von Mg^{++}, Mn^{++} und Zn^{++} beeinflußt. Alanin, ein (zumindest initial) häufiges Produkt des anaeroben Stoffwechsels, wurde als negativer Modulator für die PK von *Helix aspersa* und zweier *Mytilus*-Arten identifiziert. Auf die PK von *Tubifex* hat Alanin jedoch keinen Einfluß. Die Aminosäure stimuliert weiters die PK-Aktivität bei Austern, nicht jedoch bei *Mytilus*.

Hohe Konzentrationen von HCO^-_3 hemmen bei *Tubifex sp.* und *Helix aspersa* die Aktivität der PK und steigern jene der PEPCK. Ca^{++}-Ionen reduzieren bei Helix aspersa in hohen Konzentrationen sowohl die PK als auch die PEPCK-Aktivität, bei Mytilus nur jene der PK. Fructosediphosphat aktiviert die PK von Helix aspersa sowie von Mytilus und hebt bereits bei niedrigen physiologischen Konzentrationen die Alaninhemmung (zumindest bei *Mytilus edulis)* völlig auf, was die Rolle von Alanin als Regulationselement in Frage stellt. Eine Produkthemmung der PK durch ATP und eine durch ITP wurde für Helix aspersa gezeigt. (Untersuchungen an *Helix aspersa* bei NOPP u. Mitarb., 1981, an Austern bei MUSTAFA u. HOCHACHKA, 1973 und 1973a, an *Mytilus* bei DE ZWAAN, 1972; DE ZWAAN u. Mitarb., 1975, und VOOYS, 1980, sowie an *Tubifex* bei HOFFMANN, 1977, und bei HOFFMANN u. Mitarb., 1979.)

Zusätzlich zu den bisher untersuchten Modulatoren, welche sämtlich ein relativ geringes Molekulargewicht aufweisen, konnten in neueren Untersuchungen an *Helix pomatia* (WIESER u. LACKNER, 1982) drei weitere Substanzen gezeigt werden, welche die Aktivität von Pyruvatkinase beeinflussen. Sie sind mit Ammonsulphat fällbar und nicht dialysierbar, ein Hinweis auf relativ hohe Molekulargewichte. Interessant ist vor allem eine als PK-Inhibitor wirkende Substanz, deren Enzymhemmung, zum Unterschied zu den bereits bekannten Stoffen, auch durch die höchsten, physiologisch vorkommenden FDP-Konzentrationen nicht eingeschränkt wird.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.zobodat.at

3.7. Succinat

Succinat wird bei systematisch recht unterschiedlichen Arten regelmäßig als Endprodukt des anaeroben Stoffwechsels bzw. als Zwischenprodukt der Propionatbildung gefunden. Es stellt sich die Frage, auf welchem Weg diese Substanz gebildet wird. Die Herkunft aus Glucose bzw. in einzelnen Fällen aus Aspartat sowie die Beteiligung einer Carboxylierungsreaktion konnte mittels Radiotracing ebenso gezeigt werden wie die Beteiligung von Malat an der Reaktionsfolge (s. 3.4.1. und 6.). Der „normale" Weg über den Citratzyklus scheint durch den anaerobiosebedingten Ausfall der Atmungskette ausgeschlossen.

Untersuchungen an Anneliden, vor allem an *Arenicola marina* (Zusammenfassung bei SCHÖTTLER, 1980), gaben weiteren Aufschluß über mögliche Wege der Bernsteinsäurebildung. Nachdem in ersten Versuchen mit 14C-Glucose außer Succinat nur Malat und Fumarat markiert worden waren und auch die Verwendung von $14CO_2$ (für die Carboxylierungsreaktion) gleiche Ergebnisse zeigte (ZEBE, 1975), lag es nahe, die schon für den Endoparasiten Ascaris beschriebene Fumarat-Reduktase-Reaktion (SEIDEMANN u. ENTER, 1961) anzunehmen.

SCHROFF und SCHÖTTLER (1977) zeigten diese Reaktion auch für *Arenicola.* Sie identifizierten NADH als Co-Substrat der über eine NADH-Chinon-Oxidoreduktase auch anaerob mit der Atmungskette verknüpften Reaktion. Auch wurde eine, wenn man die zu erwartende Schädigung der an der Phosphorylierung beteiligten Mitochondrienmembran in Rechnung stellt, äquimolare Bildung von einem ATP pro Molekül (aus Malat) gebildetem Succinat gefunden.

Bei isolierten Tubifexmitochondrien wurden nach Inkubation mit 14C-Malat neben Pyruvat, Fumarat und Succinat auch die Citratzyklusmetaboliten Citrat und 2-Ketoglutarat sowie eine Freisetzung von markiertem CO_2 entdeckt. Zur Erklärung dieser Befunde (und Berücksichtigung der Forderung nach einem Ausgleich der Redoxbilanz) wurde ein Modell entwickelt, demzufolge der Citratzyklus vollständig, aber in zwei gegenläufige Hälften geteilt, funktioniert (SCHÖTTLER, 1980, s. Abb. 6). Nach diesem Schema reagieren 2 Malatmoleküle (eines über Acetyl-CoA, eines über Oxalacetat) über Citrat zu einem Succinatmolekül sowie fünf weitere über Fumarat zu (5) Succinat.

$$2\ \text{Malat} + 5\ NAD^+ \rightarrow 1\ \text{Succinat} + 5\ NADH + H^+ + 4CO_2$$
$$5\ \text{Malat} + 5\ NADH + H^+ \rightarrow 5\ \text{Succinat} + 5\ NAD^+$$
$$7\ \text{Malat} \rightarrow 6\ \text{Succinat} + 4\ CO_2$$

Eine ähnliche Teilung des Citratzyklus in zwei gegenläufige Reaktionsketten, welche beide in die Bildung von Succinat münden, nehmen DE ZWAAN u. Mitarb. (1982) für den isolierten Adductormuskel von *Mytilus* an.

Ausgangsprodukte sind Malat und Oxalacetat (glycolytisch oder aus Aspartat gebildet).

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.zobodat.at

Succinat ist jedoch nicht ausschließlich ein bei andauernder Anaerobiose vom weiteren Stoffwechsel isoliertes Endprodukt. Bei *Mytilus* wurde mittels Inkubation von 2,3 (14C) Succinat ein fortlaufender Umsatz von Succinat nachgewiesen (WIJSMAN u. Mitarb., 1977). Je nach Dauer der Anaerobiose wird so markiertes Succinat vor allem zu Malat, Aspartat, Glutamat und Propionat umgebaut. Auf Grund dieser Ergebnisse nehmen die Autoren Reaktionen über einen vollständigen Citratzyklus an. Eine Möglichkeit, die für *Mytilus* schon von DE ZWAAN u. Mitarb. (1975) aufgezeigt worden ist. Die im Vergleich zu den vorhergehenden Versuchen mit gleichmäßig (an allen C) markiertem Succinat (DE ZWAAN u. Mitarb., 1975) relativ geringe Freisetzung von markiertem CO_2 erklärt sich mit der nach dem angenommenen Reaktionsverlauf erst im zweiten Umlauf stattfindenden Decarboxylierung von markiertem Kohlenstoff. Die Regeneration der gebildeten Reduktionsäquivalente könnte über eine entsprechend synchronisierte Fumarat-Reduktase verlaufen (Abb. 6).

Das über die angeführte Reaktion gebildete Succinat ist auch in relativ hohen Konzentrationen weitgehend ungiftig. Die Stabilität wird bei einigen daraufhin untersuchten Enzymen durch die Gegenwart von Succinat sogar noch erhöht (BOWLUS u. SOMERO, 1979).

3.8. Acetat und Propionat

Von den flüchtigen Fettsäuren werden hauptsächlich Propionat sowie (meist in geringerem Ausmaß) Acetat (*Mytilus:* KLUYTMANS u. Mitarb., 1975 und 1977; ZUBURG u. KLUYTMANS, 1980; *Helix:* VOGEL, 1983; *Nereis:* SCHÖTTLER, 1978; *Tubifex:* SCHÖTTLER u. SCHROFF, 1976; *Arenicola:* SCHROFF u. ZEBE, 1980), bei manchen Arten auch vorwiegend Acetat (*Echinococcus:* AGOSIN u. REPETTO, 1965) im Zuge des anaeroben Stoffwechsels angereichert.

Übereinstimmend wird die Bildung von Propopionat über Succinat angenommen. Durch den Einsatz von 14C-2,3-Succinat konnte bei *Ascaris* Methyl-Malonyl-CoA als Zwischenprodukt identifiziert werden (SCHROFF, 1979, zit. bei SCHÖTTLER, 1980). Die Bildung erfolgt also über den Weg, über welchen sonst Propionat als Abbauprodukt ungeradzahliger Fettsäuren (vor allem aus dem Aminosäurenstoffwechsel) in den Citratzyklus eingeschleust wird. Der Autor konnte auch eine mit der Propionatbildung annähernd äquimolar verknüpfte ATP-Synthese nachweisen.

Ebenfalls an isolierten Mitochondrien aus dem Hautmuskelschlauch von *Ascaris* wurde die Acetat-Bildung untersucht (WIENHAUSEN, 1979, zit. bei SCHÖTTLER, 1980) und eine vermutlich über den Pyruvat-Dehydrogenasekomplex verbundene Decarboxylierungsreaktion (Arsenit-Hemmung) mit äquimolarer ATP-Synthese gefunden. Pyruvat entsteht dabei nicht, oder nicht ausschließlich, durch die Pyruvatkinasereaktion, sondern durch eine (vermutlich mitochondriale) Decarboxylierung von Malat.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.zobodat.at

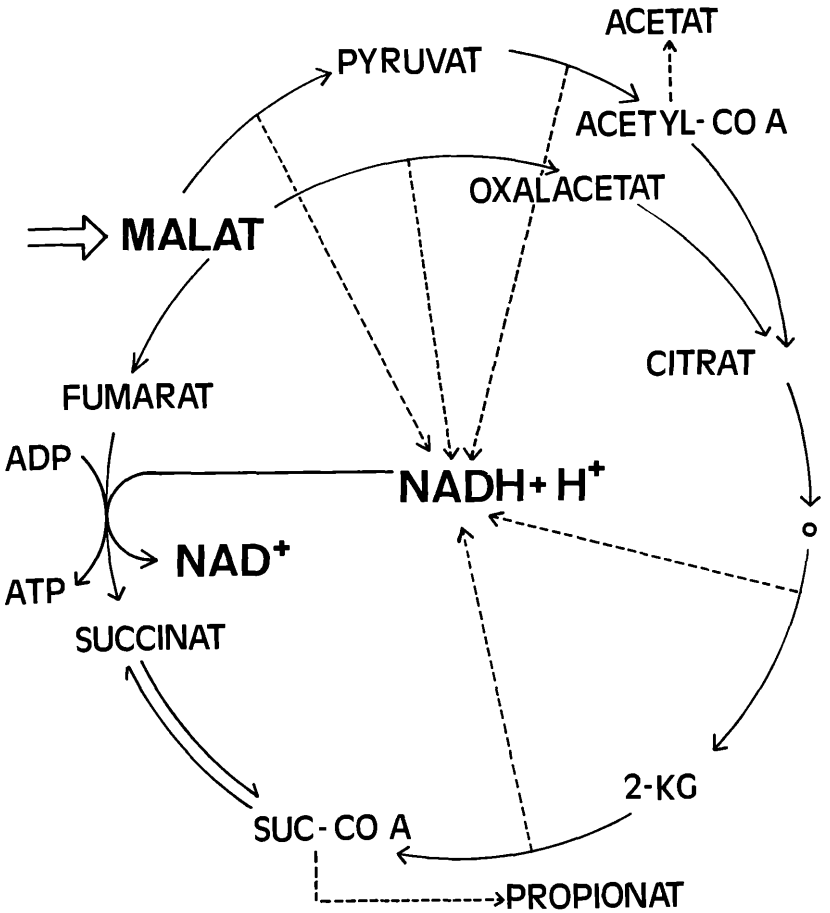


Abb. 6: Anaerobe Reaktionen im Citratzyklus (nach SCHÖTTLER, 1980). Erläuterungen im Text.

4. Diskussion

4.1. Ausgleich der Redoxbilanz

Die Diskussion anaerober Stoffwechselwege ist eng verknüpft mit der Frage nach dem Ausgleich der Redoxbilanz. Verschiedene Metaboliten kommen als terminale Elektronenakzeptoren (an Stelle des Sauerstoffs) in Betracht. Bei der Milchsäuregärung erfolgt die Reoxidation von NADH durch die Reduktion von Pyruvat zu Lactat. Wie den bisherigen Ausführungen zu entnehmen ist (s. auch Abb. 7), bieten sich dafür vor allem folgende Alternativen an:

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.zobodat.at

a) Die analog zur Lactatdehydrogenasereaktion verlaufende Bildung von Octopin, Strombin, Alanopin oder (mit Einschränkungen) von Alanin. Die erwähnten Reaktionen sind energetisch mit der Lactatbildung gleichwertig (bezogen auf gebildetes ATP), führen aber zur Bildung ungiftigerer Endprodukte bzw. sind mit Entgiftungsreaktionen gekoppelt.

b) NADH (bzw. NADPH) kann durch die Bildung von Malat aus Oxalacetat (MDH) oder aus Pyruvat (ME) reoxidiert werden.

c) Über die Fumarat-Reductase-Reaktion kann (zumindest innermitochondrial) sowohl bei Vorliegen eines unvollständigen als auch eines vollständigen Citratzyklus NAD^+ regeneriert werden. Nimmt man, ausgehend von Malat, zwei gegenläufige Reaktionen des Citratzyklus an, so ergibt sich, nachstehendem Schema im Uhrzeigersinn folgend, die Produktion von fünf Mol NADH pro Mol Malat; ein Molekül reagiert über Oxalacetat, eines über Acetyl-CoA. Durch die Reduktion fünf weiterer Malatmoleküle kann NADH wieder (vollständig) oxidiert werden.

Nachdem beide gegenläufigen Reaktionen, abgesehen von der Kopplung über das NAD^+/NADH-System, voneinander unabhängig ablaufen, ist auf diesem Weg auch der Redoxbilanzausgleich anderer, NADH bildender oder verbrauchender Reaktionen, möglich. Gleiches gilt für einen vollständig ablaufenden Citratzyklus mit ebenfalls nur über die Redoxbilanz verknüpfter reduktiver Succinatbildung.

4.2. Energieliefernde Reaktionsschritte

Abgesehen von den Reaktionen der Phosphoglyceratkinase, Pyruvatkinase und Phosphoenolpyruvatkinase (PK und PEPCK s. 3.6.1.) werden auch noch andere, auch in Abwesenheit von Sauerstoff stattfindende Nucleotid-Phosphorylierungsreaktionen vermutet. Diese Mechanismen (s. o.) sollen im Folgenden unter energetischen Gesichtspunkten betrachtet werden.

Die Reaktion der Fumarat-Reduktase:

$$\text{Fumarat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Succinat} + \text{NAD}^+$$

kann bei einem $\Delta G^{o\prime}$ (Änderungen der freien Energie unter Standardbedingungen und pH = 7) von ca. −16,2 kcal/Mol (oder 30,6 kJ/Mol), mit der äquimolaren Bildung von ATP verknüpft werden (z. B. SCHROFF u. SCHÖTTLER, 1977). Berechnet man den zur Bildung von ATP benötigten Energiebedarf mit 7,3 kcal/Mol (oder 30,6 kJ/Mol), so ergibt sich ein thermodynamischer Wirkungsgrad von etwa 45 %. Geht man nicht von Standardbedingungen, sondern von annähernd physiologischen Gegebenheiten aus, so liegt die Effizienz noch weit höher. Auch die anaerobe Bildung von Propionat (aus Succinat, SCHROFF, 1979, zit. bei SCHÖTTLER, 1980) und die anaerobe Acetatbildung (WIENHAUSEN, 1979, zit. bei SCHÖTTLER, 1980) sind wahrscheinlich mit Phosphorylierungsfunktionen verbunden. Der entscheidende Schritt der Propionatbildung ist die Decarboxylierung von Methylmalonyl-CoA zu Propionyl-

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.zobodat.at

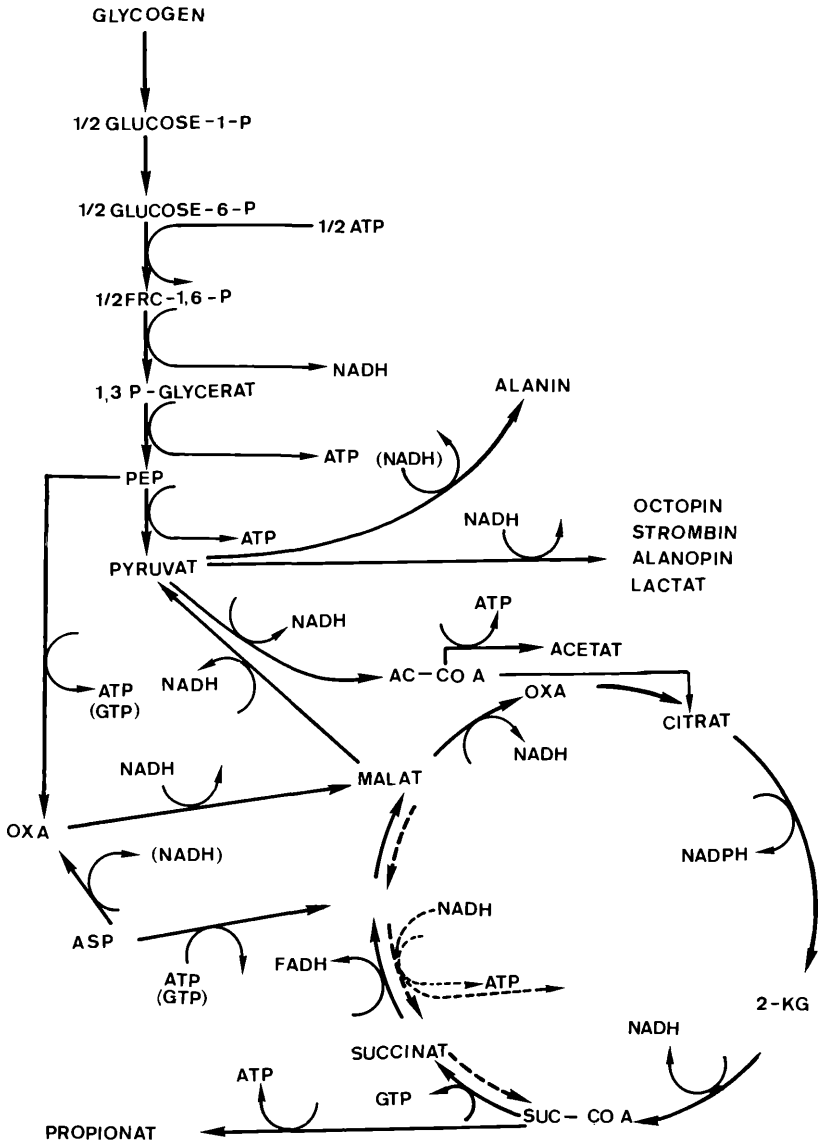
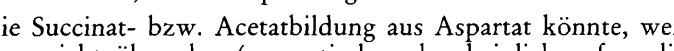


Abb. 7: Redox- und Phosphorylierungsreaktionen häufig postulierter Reaktionswege des anaeroben Katabolismus (Überblick).

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.zobodat.at

CoA (s. o., ΔG nach GNAIGER, 1977: −7,9 kcal bzw. -33 kJ unter „annähernd physiologischen Bedingungen" s. u.). Die Phosphorylierungsreaktion des Citratzyklus, die Reaktion der Succinyl-Thiokinase (Suc-CoA Synthetase).



Succinyl-CoA + Pi + GDP → Succinyl + GTP + CoA-SH
($\Delta G^{01} = -0{,}7$)

kann ebenfalls anaerob Energie bereitstellen, wenn durch Ausgleich der Redoxbilanz der Ablauf des Citratzyklus möglich ist.

In den nachstehenden Berechnungen des auf diese Weise erreichbaren Gewinns von ATP wird von eingesetzten Glucoseeinheiten ausgegangen. Nimmt man glycogengebundene Glycosyleinheiten als Ausgangsbasis, so entfällt ein Phosphorylierungsschritt und die Produktion von ATP liegt um ein Molekül je Einheit höher.

Sind mittels Lactatgärung 2 ATP/Glucose erreichbar, so lassen sich, folgt man der Vorstellung eines gegenläufigen Citratzyklus, für die Bildung von Succinat ca. 4,6 ATP/Glucose errechnen, für die Bildung von Propionat beträgt der auf diese Weise erreichbare Gewinn von ATP sogar etwas mehr als 5 Moleküle pro Glucoseeinheit. Geht man von einem vollständigen Citratzyklus mit parallel verlaufender Reduktion von Fumarat aus, so erhält man ähnliche Werte. Wird auch Acetat gebildet, was in Verbindung mit gleichzeitiger Succinat- bzw. Propionatbildung möglich sein sollte, so liegt der erreichbare Phosphorylierungsgewinn ebenfalls bei ca. 4,5−5 ATP pro eingesetztem Glucosemolekül.

Die Succinat- bzw. Acetatbildung aus Aspartat könnte, wenn die Reaktion nicht über den (energetisch wahrscheinlich aufwendigeren) Purinnucleotidzyklus sondern über die Bildung von Oxalacetat und Malat erfolgt, mit dem Gewinn von einem Molekül ATP pro eingesetztem Aspartatmolekül verbunden sein. Phosphorylierende Reaktionen wären die Fumaratreduktase bzw. der Pyruvatdehydrogenasekomplex. Im Falle der Propionatbildung wären auch zwei ATP pro Molekül Aspartat möglich. Bei einer äquimolaren Bildung von Succinat (bzw. Propionat) und Acetat kann die Redoxbilanz ausgeglichen werden, wenn man eine Transaminierungsreaktion für die Abspaltung der Aminogruppe annimmt und die Zellkompartimentierung unberücksichtigt läßt.

Die zur Bildung von Octopin, Strombin und Alanin führenden Reaktionen sind energetisch mit der Lactatgärung gleichwertig, wenn man nur die ATP-Bildung berücksichtigt.

Mit der Bildung von fünf Molekülen ATP pro Glucosemolekül werden mehr als das Zweifache der Milchsäuregärung und ca. 15 % der bei Anwesenheit von Sauerstoff erreichbaren Energieausbeute gefunden. GNAIGER (1977) errechnete die thermodynamische Effektivität (= Prozentsatz der als ATP gebundenen Abnahme freier Energie) für die Bildung der einzelnen Metaboliten aus Glucose. Sie beträgt für Lactat 45,4, für Alanin 45,2, für Succinat 64,2, für Propionat 53,2−77,7, für Acetat/Succinat 54,1−65,6 und für Acetat/Propionat 43,3−69,3 Prozent.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.zobodat.at

Die thermodynamische Effektivität des aeroben Glucoseabbaus liegt bei 58,6 %. Alle Zahlen sind von „Normalbedingungen" auf „annähernd physiologische Bedingungen" (0,2 atm. O_2, 0,05 atm. CO_2 [aq.], pH = 7, andere Reaktanten 0,01 M) umgerechnet. Für die Propionatbildung (aus Succinat) wurde in obiger Rechnung nur die (entscheidende) Decarboxylierungsreaktion herangezogen. Die Reaktion der Methyl-Malonyl-Mutase und der CoA-Transferase wurde als frei reversibel vernachlässigt.

Wie zu sehen ist, wird unter anaeroben Bedingungen keine Energie „verschenkt", sondern die Abnahme der freien Energie ist teilweise noch effektiver mit der Bildung von ATP verknüpft, als dies bei Anwesenheit von Sauerstoff der Fall ist.

5. Zusammenfassung

Anaerober Energiestoffwechsel tritt als Anpassung an verschiedene Umweltparameter (niedrige O_2-Tension, Austrocknungsgefahr) und bei physiologisch bedingter, unzureichender O_2-Zufuhr (ineffektive Sauerstoffverteilungsmechanismen, vor allem bei hoher Belastung) bei fast allen untersuchten Evertebratengruppen auf. Die dabei auftretenden Stoffwechselwege gehen dabei meist über die „klassische" Milchsäuregärung hinaus. Statt dessen, oder zumindest zusätzlich, werden weiterreichende Wege beschritten. Ziel dieser Mechanismen, bei denen der Sauerstoff durch ein organisches Molekül als Elektronenakzeptor ersetzt ist, ist die Erreichung einer möglichst hohen Energieausbeute verbunden mit der Bildung relativ ungiftiger Endprodukte. Beim anaeroben Katabolismus wird die mit der Nahrung aufgenommene Energie keineswegs „verschwendet", sondern teilweise noch effektiver (in Form von ATP) gebunden, als dies bei Anwesenheit von Sauerstoff der Fall ist. Die dabei beschrittenen Stoffwechselwege werden in der vorliegenden Arbeit ausführlich diskutiert.

6. Literatur

AGOSIN, M., and REPETTO, Y.: Studies on the metabolism of *Echinococcus granulosus*-VIII. The pathway to succinate in *E. granulosus* scolices. Comp. Biochem. Physiol. 14, 299–309 (1965).

BAGINSKI, R. M., and PIERCE, S. K. Jr.: A comparison of amino acid accumulation during high salinity adaptation with anaerobic metabolism in the ribbed mussel *Modiolus demissus demissus*. J. exp. Zool. 203, 419–428 (1978).

BALDWIN, B. L.: Ventilation, the heart beat, and oxygen uptake by *Mytilus edulis* in declining oxygen tension. Comp. Biochem. Physiol. 40, 1065–1085 (1971).

BALDWIN, J., and LEE, A. K.: Contributions af aerobic and anaerobic energy production during swimming in the bivalve mollusc *Limaria fragilis* (family Limidae). J. Comp. Physiol. 129, 361–364 (1979).

BALDWIN, J., and OPIE, A. M.: On the role of octopine dehydrogenase in the adductor muscle of bivalve molluscs. Comp. Biochem. Physiol. 61B, 85–92 (1978).

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.zobodat.at

BAYNE, B. L., and LIVINGSTONE, D. R.: Responses of *Mytilus edulis* L. to low oxygen tension: Acclimation of the rate of oxygen consumption. J. comp. Physiol. 114, 129–142 (1977).

BORDEREAU, Ch.: Anaerobiosis in the queen of *Macrotermes bellicosus* (Isoptera, Termitidae). Insectes sociaux 23 (2), 109–116 (1976).

BOWLUS, R. D., and SOMERO, G. N.: Solute compatibility with enzyme function and structure: Rationales for the selection of osmotic agents and end-products of anaerobic metabolism in marine invertebrates. J. exp. Zool. 208, 137–152 (1979).

BRAND, T. V., and MEHLMANN, B.: Relations between pre- and postanaerobic oxygen tension in some freshwater snails. Biol. Bull. 104, 301–312 (1953).

BRAND, T. V., and Mitarb.: Postanaerobic and preaanaerobic metabolism of snails. Biol. Bull. 98, 266–276 (1950).

BUEDING, E.: Studies on the metabolism of the filarial worm *Litomosoides carinii*. Exper. Med. 89, 107–130 (1949).

BUEDING, E., and FARROW, G. W.: Identification of succinic acid as a constituent of *Ascaris luumbricoides*. Exp. Parasitol. 5, 345–349 (1956).

CAMPBELL, J. W., and VORHABEN, J. E.: The purine nucleotide cycle in Helix hepatopancreas. J. comp. Physiol. 129, 137–144 (1979).

COLEMAN, N., and TRUEMAN, E. R.: The effect of aerial exposure on the activity of the mussels *Mytilus edulis* L and *Modiolus modiolus* (L.). J. exp. Biol. Ecol. 7, 295–304 (1971).

COLLICUT, J. M., and HOCHACHKA, P. W.: The anaerobic oyster heart: Coupling of glucose and asparate fermentation. J. comp. Physiol. 115, 147–157 (1977).

CONRADI-LARSEN, E.-M., and SØMME, L.: Anaerobiosis in the overwintering beetle *Pelophila borealis*. Nature 400 (5), 2087 (1973).

DANDO, P. R.: Strombine (N-[carboxymethyl]D-alanine)dehydrogenase and alanopine (meso-N-[carboxyethyl]alanine)dehydrogenase from the mussel *Mytilus edulis* L. Biochem. Soc. Trans. 9, 297–298 (1981).

DANDO, P. R., STOREY, K. B., HOCHACHKA, P. W., and STOREY, J. M.: Multible dehydrogenases in marine molluscs: Electrophoretic analysis of alanopine dehydrogenase, strombine dehydrogenase, octopine dehydrogenase and lactate dehydrogenase. Mar. Biol. Lett. 2, 249–257 (1981).

FAIRBAIRN, D.: The metabolism of *Heterakis gallinae* 2. Carbon dioxide fixation. Exp. Parasitol. 3, 52–63 (1954).

FALKOWSKY, P. G.: Facultative anaerobiosis in *Limulus polyphenus:* Phosphoenolpyruvate carboxykinase and heart activities. Comp. Biochem. Physiol. 49B (4), 749–759 (1974).

FELDBECK, H.: Investigations on the role of amino acids in anaerobic metabolism of the lugworm *Arenicola marina* J. Comp. Physiol. 137, 183–192 (1980).

FENCHEL, T.: The ecology of marine microbenthos. Ophelia 6, 1–182 (1969).

FENCHEL, T.: The reduction – oxidation properties of marine sediments and the vertical distribution of the microfauna: Proceedings 3rd European Marine Biological symposion. Arcachon 1968 (1970).

FENCHEL, T. M., and RIEDL, R. J.: The sulfide system: a new biotic community underneath the oxidiced layer of marine sand bottoms. Mar. Biol. 7, 255–268 (1970).

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.zobodat.at

FIELDS, J. H. A.: Enzymes of the citrate branchpoint in the adductor muscle of the oyster. Ph. D. Thesis University of British Columbia (1976).

FIELDS, J. H. A.: A dehydrogenase requiring alanine and pyruvate as substrate from oyster adductor muscle. Fed. Proc. 35, 1687 (1976).

FÜSSER, H., und KRUGER, F.: Vergleichende Untersuchungen zur Atmungsphysiologie von *Planorbis corneus* und *Lymnea stagnalis* (Gastropoden, Pulmonaten). Z. vergl. Physiol. 33, 14–52 (1951).

GÄDE, G.: Anaerobic metabolism of the common cockle *Cardium edule* 1. The utilisation of glycogen and accumulation of multible end products. Arch. Int. Phys. Biochim. 83, 879–886 (1975).

GÄDE, G.: The energy metabolism of the foot muscle of the jumping cockle, *Cardium tuberculatum*. J. Comp. Physiol. 137, 177–182 (1980).

GÄDE, G.: A comparative study of octopine dehydrogenase isoenzymes in gastropod, bivalve and cephalopod molluscs. Comp. Biochem. Physiol. 67B, 575–582 (1980).

GÄDE, G., and GRIESHABER, M.: Anaerobic metabolism of the common cockle *Cardium edule* 2. Partial purification and properties of lactate dehydrogenase and octopine dehydrogenase. A comparative study. Arch. Int. Phys. Biochim. 84, 735–752 (1978).

GÄDE, G., und ZEBE, E.: Über den Anaerobiosestoffwechsel von Molluskenmuskeln. J. comp. Physiol. 85, 291–304 (1973).

GNAIGER, E.: Thermodynamic considerations of invertebrate anoxibiosis. In: I. Lamprecht and B. Schaarschmidt (Hrsg.): Application of calorimetry in live science, Walter de Gruyter, Berlin, 1977.

GRIESHABER, M.: Breakdown and formation of high energy phosphates and octopine in the adductor muscle of the scallop *Clamys opercularis* (L.) during escape, swimming and recovery. J. comp. Physiol. 126, 269–276 (1978).

GRIESHABER, M., and GÄDE, G.: The biological role of octopine in the squid, *Loligo vulgaris* (Lamarck). J. comp. Physiol. 108, 225–232 (1976).

GRIESHABER, M., and GÄDE, G.: Energy supply and the formation of octopine in the adductor muscle of the scallop *Pecten jacobaeus* (Lamarck). Comp. Biochem. Physiol. 85B, 249–252 (1977).

HARPUR, R., and JACKSON, D. M.: Intestine of *Ascaris* oxygen consumption, fermention acids and anaerobic synthesis of protein. J. Parasitol. 61 (5), 808–814 (1975).

HENRY, R. P., MAGNUM, C. P., and WEBB, K. L.: Salt and water balance in the oligohaline clam *Rangia cuneata* 2. Accumulation of intracellular free amino acids during high salinity adaptation. J. Exp. Zool. 211, 11–29 (1980).

HESSE, O.: Zum Hungerstoffwechsel der Weinbergschnecke. Z. allg. Physiol. 10, 273–340 (1910).

HOCHACHKA, P. W., HARTLINE, P. H., and FIELDS, J. H. A.: Octopine as an end product of anaerobic glycolysis in the chambered nautilus. Science 195, 72–74 (1976).

HOCHACHKA, P. W., and MUSTAFA, T.: Invertebrate facultative anaerobiosis. A reinterpretation if invertebrate enzyme pathway suggests new approaches to helminth chemotherapy. Science 178, 1056–1060 (1972).

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.zobodat.at

HOCHACHKA, P. W., and MUSTAFA, T.: Enzymes in facultative anaerobiosis of molluscs – 1. malic enzyme of oyster adductor muscle. Comp. Biochem. Physiol. 45B, 625–637 (1973).

HOFFMANN, K. H.: The regulatory role of muscle pyruvate kinase in carbonhydrate metabolism of invertebrates: A comparative study in catalytic properties of enzymes isolated from *Tubifex tubifex* (Oligochaeta) and Tenebrio molitor (Coleoptera). Physiol. Zool. 50, 142–155 (1977).

HOFFMANN, K. H., MUSTAFA, T., and JORGENSEN, J. B.: Role of pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, malic enzyme and lactat dehydrogenase in anaerobic energy metabolism of *Tubifex spec.* J. Comp. Physiol. 130, 337–344 (1979).

JONES, J. D.: Aspects of respiration in *Planorbis corneus* L. and *Lymnea stagnalis* L. (Gastropoda: Pulmonata). Comp. Biochem. Physiol. 4, 1–29 (1961).

KLUYTMANS, J. H., DE BONT, A. M. T., JANUS, J., and WIJSMAN, T. C. M.: Time dependent changes and tissue specifities in the accumulation of anaerobic fermentation products in the sea mussel *Mytilus edulis* L. Comp. Biochem. Physiol. 58B, 81–87 (1977).

KLUYTMANS, J. H., VEENHOF, P. R., and DE ZWAAN, A.: Anaerobic production of volatile Fatty acids in the sea mussel *Mytilus edulis* L. J. comp. Physiol. 104, 71–78 (1975).

KLUYTMANS, D., ZANDEE, I., ZUBURG, W., and PIETERS, H.: The influence of seasonal changes on energy metabolism in *Mytilus edulis* (L.) – 3. Anaerobic energy metabolism. Comp. Biochem. Physiol. 67B, 307–315 (1980).

KMETEC, E., and BUEDING, E.: Succinic and reduced diphosphopydridine nucleotide oxidase system of *Ascaris muscle*. J. Biol. Chem. 236, 584–591 (1961).

KMETEC, E., and BUEDING, E.: Production of succinate by the canine whipworm *Trichurus vulpis*. Comp. Biochem. Physiol. 15, 271–274 (1965).

KÖHLER, P., and HASELMANN, K.: Anaerobic and aerobic energy metabolism in the larvae (Tetrahyridia) of *Mesocestoides corti*. Exp. Parasitol. 36, 176–188 (1974).

KÖHLER, P., and STAME, O. F.: Metabolic end products of anaerobic carbonhydrate metabolism of *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda). Comp. Biochem. Physiol. 43B, 733–741 (1972).

KOORMAN, R., and GRIESHABER, M.: Investigations on the energy metabolism and on octopine formation of the common whelk, *Buccinum undatum* L., during escape and recovery. Comp. Biochem. Physiol. 65B, 543–547 (1980).

KRATOCHVIL, H.: Langfristige Messungen des Sauerstoffverbrauches und der Herzschlagrate an trockenschlafenden Landpulmonaten. Zool. Anz. Jena 196, 289–317 (1976).

KUGER, W. M. A., GAZZINGLLI, G., FIGUEIREDO, E. A., and PELLEGRINO, J.: Oxygen uptake and lactate production by *Schistosoma mansoni* cercarid, cerecardial body and tail schistomile. Comp. Biochem. Physiol. 60B, 41–46 (1978).

KÜHNELT, W.: Über Kalklösung durch Landschnecken. Zool. Jahrb. Ökol. 63, 131–144 (1932).

KÜHNELT, W.: Beziehungen zwischen Kalkstoffwechsel und Atmung bei Mollusken der Meeresküste. Zool. Anz. 124, 182–190 (1938).

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.zobodat.at

LIVINGSTONE, D. R.: Anaerobic metabolism in the posterior adductor muscle of the common mussel *Mytilus edulis* L. in response to altered oxygen tension and temperature. Physiol. Zool. 51, 131–139 (1978).

LIVINGSTONE, D. R., and BAYNE, B. L.: Pyruvate kinase from the mantle tissue of *Mytilus edulis* L. Comp. Biochem. Physiol. 48B, 481–497 (1974).

LIVINGSTONE, D. R., and BAYNE, B. L.: Responses of *Mytilus edulis* L. to low oxygen tension of the posterior adductor muscle and mantle tissues. J. comp. Physiol. 114, 143–155 (1977).

LIVINGSTONE, D. R., WIDDOWS, J., and FIETH, P.: Aspects of nitrogen metabolism of the common mussel *Mytilus edulis:* Adaptation to abrupt and fluctuating changes in salinity. Mar. Biol. 53, 41–55 (1979).

LIVINGSTONE, D. R., DE ZWAAN, A., and THOMPSON, R. J.: Aerobic metabolism, octopine production and phosphoarginine as sources of energy in the phasic and catch adductor muscle of the giant scallop *Placopecten magellanicus* during swimming and the subsequent recovery period. Comp. Biochem. Physiol. 70B, 35–44 (1981).

MASSARO, E. J.: Horsshoe crab lactate dehydrogenase. Science 167, 994–996 (1970).

MCMANUS, D. P., and JAMES, B. L.: Anaerobic glucose metabolism in the digestive gland of *Littorina saxatilis rudis* (Manton) and in the daughter sprocysts of *Microphallus similis* (Jäg.) (Digenea: Microphallidae). Comp. Biochem. Physiol. 51B, 293–297 (1975).

MEINARDUS, G. & GÄDE, G.: Anaerobic metabolism of the common cockle, *Cardium edule* – 4. Time dependent changes of metabolism in the foot and gill tissue induced by anoxia and electrical stimulation. Comp. Biochem. Physiol. 70B, 271–277 (1981).

MOON, T. W., HULBERT, W. C., MUSTAFA, T., and METTRICK, D. F.: A study of lactate dehydrogenase and malat dehydrogenase in adult *Hymenolepis diminuta* (Cestoda). Comp. Biochem. Physiol. 56B, 249–254 (1977).

MOON, T. W., MUSTAFA, T., HULBERT, W. C., PODESTA, R. B., and METTRICK, D. F.: The phosphoenolpyruvatebranchpoint in adult *Hymenolepis diminuta* (Cestoda). A study of pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase. J. Exp. Zool. 200, 325–336 (1977).

MUSTAFA, T. & HOCHACHKA, P. W.: Enzymes in facultative anaerobiosis of molluscs – 2. Basic catalytic properties of phosphoenolpyruvate carboxykinase in oyster adductor muscle. Comp. Biochem. Physiol. 45B, 639–655 (1973).

MUSTAFA, T., and HOCHACHKA, P. W.: Enzymes in facultative anaerobiosis of molluscs – 3. Phosphoenolpyruvate carboxykinase and its role in aerobic-anaerobic transition. Comp. Biochem. Physiol. 45B, 657–667 (1973).

NARANG, S.: Lactate dehydrogenase of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca: Pulmonata) – 1. Physico-chemical characterisation of lactat dehydrogenase of various tissues. Comp. Biochem. Physiol. 47B, 641–655 (1974).

NOPP, H.: Physiologische Aspekte des Trockenschlafs der Landschnecken. Sitzungsber. Österr. Akad. Wiss., math.-naturwiss. Kl. 1, 182, 1–75 (1974).

NOPP, H., MAURER, L., and SCHUBERT, Ch.: Über die Pyruvat-Kinase (E. C. 2. 7. 1. 40) und die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (E. C. 4. 1. 1. 23) aus der

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.zobodat.at

Mitteldarmdrüse winterschlafender *Helix aspersa* O. F. Müll. Sitzungsber. Österr. Akad. Wiss., math.-naturwiss. Kl. 1, 190, 99–109 (1981).

PLAXTON, W. C., and STOREY, K. B. Alanopine dehydrogenase: Purification and characterization of the enzyme from *Littorina litorinea* foot muscle. J. Comp. Physiol. 149, 57–65 (1982).

PRESTWICH, K. N., and ING, N. H.: The activities of enzymes associated with anaerobic pathways, glycolysis and the krebs cycle in spiders. Comp. Biochem. Physiol. 72B, 295–302 (1982).

SAZ, H. J., and KOLWALSKI, B. J.: Transhydrogenase and anaerobic phosphorylation in *Hymenolepis diminuta* mitochondria. Comp. Biochem. Physiol. 43B, 725–732 (1972).

SCHMIDT-NILSEN, K., TAYLOR, C. R., and SHOKLNIK, A.: Desert snails: problems of heat, water and food. J. Exp. Biol. 55, 385–398 (1971).

SCHÖTTLER, U.: Untersuchungen zum anaeroben Kohlenstoffabbau in *Tubifex tubifex*. Diss. Münster (1974).

SCHÖTTLER, U.: Über den Anaerobiosestoffwechsel von *Tubifex* Verh. Dtsch. Zool. Ges. 1974, 271–274 (1975).

SCHÖTTLER, U.: Investigations of the anaerobic metabolism of the polychaet worm *Nereis diversicolor* M. J. comp. Physiol. 125, 185–189 (1978).

SCHÖTTLER, U.: The influence of anaerobiosis on the levels of adenosine nucleotides and some glycolytic metabolites in *Tubifex sp.* (Annelida, Oligochaeta). Comp. Biochem. Physiol. 61B, 29–32 (1978).

SCHÖTTLER, U.: Der Energiestoffwechsel bei biotop-bedingter Anaerobiose: Untersuchungen an Anneliden. Verh. Dtsch. Zool. Ges. 1980, 228–240 (1980).

SCHÖTTLER, U., and SCHROFF, U.: Untersuchungen zum anaeroben Glycogenabbau bei *Tubifex M.* J. comp. Physiol. 108, 243–254 (1976).

SCHÖTTLER, U., and WIENHAUSEN, G.: The importance of the phosphoenolpyruvate carboxykinase in the anaerobic metabolism of two marine polychaets. – In vivo investigations on *Nereis virens* and Arenicola marina. Comp. Biochem. Physiol. 68B, 41–48 (1981).

SCHROFF, G.: Die Bildung von Propionsäure bei *Arenicola marina* (Polychaeta, Annelida). Untersuchungen an isolierten Mitochondrien. Diss. Münster (1979).

SCHROFF, G., and SCHÖTTLER, U.: Anaerobic reduction of fumarate in the body wall musculature of *Arenicola marina* (Polychaeta). J. comp. Physiol. 116, 325–336 (1977).

SEIDMAN, I., and ENTNER, N.: Oxidative enzymes and their role in phosphorylation in sarcosomes of adult *Ascaris lumbricoides*. J. Biol. Chem. 236, 915–919.

SIMPSON, J. W., and AWAPARA, J.: Phosphoenolpyruvat carboxykinase activity in invertebrates. Comp. Biochem. Physiol. 12, 457–464 (1964).

SIMPSON, J. W., and AWAPARA, J.: The pathway of glucose degradation in some invertebrates. Comp. Biochem. Physiol. 18, 537–548 (1966).

SOLLOCK, R. L., VORHABEN, J. E., and CAMPBELL, J. W.: Transaminase reactions and glutamate dehydrogenase in Gastropod hepatopancreas. J. comp. Physiol. 129, 129–135 (1979).

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.zobodat.at

SØMME, L.: Anaerobiosis in some alpine coleoptera. Norsk. ent. T. 21, 155–158 (1974).

STOKES, T. M., and AWAPARA, J.: Alanine and succinate as end-products of glycose degradation in the calm *Rangia cuneata.* Comp. Biochem. Physiol. 25, 883–892 (1968).

STOREY, K. B.: Lactate dehydrogenase in tissue extracts of the land snail *Helix aspersa:* Unique adaptions of LDH subunits in a facultative anaerobe. Comp. Biochem. Physiol. 56B, 181–187 (1977).

STOREY, K. B., and STOREY, J. M.: Octopine metabolism in the cuttlefish, *Sepia officinalis:* Octopine production by muscle and its role as an aerobic substrate for non-muscular tissue. J. Comp. Physiol. 131, 311–319 (1979).

REW, R. S., and SAZ, H. J.: Enzyme localisation in the anaerobic mitochondria of *Ascaris lumbricoides.* J. Cell. Biol. 63, 125–135 (1974).

ROBIN, Y. N. VAN THOAI: Métabolisme des dérivés guanidylés 10. Métabolisme de l'octopine: son role biologique. Biochim. Biophys. Acta 52, 233–240.

THILLART, G., WAARDE, A. v., DOBBE, F., and KESBEKE, F.: Anaerobic energy metabolism of goldfish, *Carassius auratus.* L. J. comp. Physiol. 146, 41–49 (1982).

THOAI, N. VAN, and ROBIN, Y.: Métabolisme des dérives guanidylés 8. Biosyntèse de l'octopine et répartition de l'enzyme l'opérant chez les invertebrés. Biochim. Biophys. Acta 35, 446–453 (1959).

THOAI, N. VAN, and ROBIN, Y.: Métabolisme des dérives guanidylés 9. Biosyntèse de l'octopine: Etude du mécanisme de la réaction et de quelques propriétés de l'octopine synthétase. Biochim. Biophys. Acta 32, 221–233 (1961).

VAN DER KOLK, H.: Über die Anhäufung organischer Säuren bei Pulmonaten während erzwungener Anaerobiose und während des Trockenschlafes. Diss. Wien, 1976.

VOGEL, W. R.: Veränderungen einiger Metabolitenkonzentrationen bei Trockenschlaf bzw. künstlich induzierter Anaerobiose von *Helix aspersa.* O. F. Müll. und *Helix pomatia* L. Diss. Wien, 1983.

VOOYS, C. G. N. DE: Anaerobic metabolism in sublittoral living *Mytilus galloprovincialis* Lam. in the mediterranean 2. partial adaptation of pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase. Comp. Biochem. Physiol. 65B, 513–518 (1980).

WAARDE, A. VAN, THILLART, G. VAN DEN, and DOBBE, F.: Anaerobic metabolism of goldfish, *Carassius aureatus* (L.) Influence of anoxia on mass-action ratios of transaminase reactions and levels of ammonia and succinate. J. comp. Physiol. 147, 53–95 (1982).

WATTS, S. D. M., and FAIRBAIRN, D.: Anaerobic excretion of fermentation acids by *Hymenolepis diminuta* during development in the definitive host. J. Parasitol. 60, 621–625 (1974).

WIDDOWS, J., BAYNE, B. L., LIVINGSTONE, D. R., NEWELL, R. I. E., and DONKIN, P.: Physiological and biochemical responses of bivalve molluscs to exposure to air. Comp. Biochem. Physiol. 62A, 301–308 (1979).

WIENHAUSEN, G.: Untersuchungen über „Schlüssel"enzyme des anaeroben Stoffwechsels und ihre Lokalisierung bei *Arenicola marina* L. Diplomarbeit Münster, 1976.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.zobodat.at

WIESER, W.: Responses of *Helix pomatia* to anoxia: Changes of solute activity and other properties of the haemolymph. J. Comp. Physiol. 141, 503–509 (1981).

WIESER, W., and LACKNER, R.: Multible control of *Helix pomatia* pyruvate kinase by high-Mr modulators. FEBS letters 138, 299–302 (1982).

WIESER, W., and PLATZER, U.: A novel metabolic response to anoxia in an invertebrate, the snail *Helix pomatia*, involving the reaction catalysed by arginase. Mol. Physiol. 4, 155–164 (1983).

WIESER, W., and WRIGHT, E.: D-lactate formation, D-LDH activity and glycolytic potential of *Helix pomatia* L. J. comp. Physiol. 126, 249–255 (1978).

WIESER, W., and WRIGHT, E.: The effects of season and temperature on D-lactate dehydrogenase, pyruvate kinase and arginine kinase in the foot of *Helix pomatia* L. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 533–542 (1979).

WIJSMAN, T. C. M., DE BONT, A. M. T., and KLUYTMANS, J. H. F. M.: Anaerobic incorporation of radioactivity from 2,3-14C-succinic acid into citric acid cycle intermediates and related compounds in the sea mussel *Mytilus edulis* L. J. comp. Physiol. 114, 167–175 (1977).

WILPS, H., and ZEBE, E.: The end-product of anaerobic carbonhydrate metabolism in the larvae of *Chironomus thummi thummi*. J. comp. Physiol. 122, 263–272 (1976).

ZEBE, E.: In-vivo-Untersuchungen über den Glucose-Abbau bei *Arenicola marina* (Annelida, Polychaeta). J. comp. Physiol. 101, 133–145 (1975).

ZUBURG, W., and KLUYTMANS, J. H.: Organ specific changes in Energy metabolism due to anaerobiosis in the sea mussel *Mytilus edulis* (L.). Comp. Biochem. Physiol. 67B, 317–322 (1980).

ZUBURG, W., and DE ZWAAN, A.: The role of amino acids in anaerobiosis and osmoregulation in bivalves. J. exp. Zool. 215, 315–325 (1981).

ZWAAN, A. DE: Het anaerobe kohlhydraatmetabolisme in de zeemossel *Mytilus edulis* L. Ph. Thesis, University of Utrecht, The Netherlands (1971).

ZWAAN, A. DE: Pyruvate kinase in the muscle extracts of the sea mussel *Mytilus edulis* L. Comp. Biochem. Physiol. 42B, 7–14 (1972).

ZWAAN, A. DE: Anaerobic energy metabolism in bivale molluscs. Oceanogr. Mar. Biol. Am. Rev. 5, 103–187 (1977).

ZWAAN, A. DE, and DE BONT, A. M. T.: Phosphoenolpyruvate carboxykinase from adductor muscle tissue of the sea mussel *Mytilus edulis* L. J. comp. Physiol. 96, 84–93 (1975).

ZWAAN, A. DE, DE BONT, A. M. T., and VERHOEVEN, A.: Anaerobic energy metabolism in isolated adductor muscle of the sea mussel Mytilus edulis L. J. comp. Physiol. 149, 137–143 (1982).

ZWAAN, A. DE, HOLWERDA, D. A., and ADDINK, A. D. F.: The influence of divalen cations on allosteric behaviour of muscle pyruvate kinase from the sea mussel *Mytilus edulis* L. Comp. Biochem. Physiol. 52B, 469–472 (1975).

ZWAAN, A. DE, and VAN MARREWIJK, W. J. A.: Intracellular localization of pyruvate carboxykinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase and „malic enzyme" and the absence of glyoxylate cycle enzymes in the sea mussel (*Mytilus edulis* L.). Comp. Biochem. Physiol. 44B, 1057–1066 (1973).

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.zobodat.at

ZWAAN, A. DE, and MOHAMED, A. M., and GERAERTS, W. P. M.: Glycogen degradation and the accumulation of compounds during anaerobiosis in the freshwater snail *Lymnea stagnalis.* Neth. J. Zool. 26, 549–557 (1977).

ZWAAN, A. de, THOMPSON, R. J., and LIVINGSTONE, D. R.: Physiological and biochemical aspects of valve snap and valve closure responses in the giant scallop *Placopecten magellanicus.* J. comp. Physiol. 137, 105–114 (1980).

ZWAAN, A. DE, and ZANDEE, D. I: The utilisation of glycogen and accumulation of some intermediates during anaerobiosis in *Mytilus edulis* L. Comp. Biochem. Physiol. 43B, 47–54 (1972).

ZWAAN, A. DE, and ZUBURG, W.: The formation of strombine in the adductor muscle of the sea mussel *Mytilus edulis* L. Mar. Biol. Lett. 2, 179–192 (1981).